

Charakterisierung Arp2/3-Komplex-vermittelter Aktinreorganisation bei der Invasion bakterieller Pathogene

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

Von Julia Ehinger
aus Wolfsburg

1. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Wehland
2. Referentin:	Prof. Dr. Petra Dersch
eingereicht am:	20.02.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am:	29.05.2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Jürgen Wehland, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Steffen A., Rottner K., **Ehinger J.**, Innocenti M., Scita G., Wehland J., Stradal T.E.B.
Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. (2004)
EMBO J; 23 (4): 749-59.

Tagungsbeiträge:

Ehinger J., Steffen A., Benesch S., Wehland J., Stradal T.E.B., Rottner K.
WAVE complex function in adhesion and engulfment of different bacterial pathogens.(2004)
6th Young Scientists Meeting of the German Society for Cell Biology (“Cytoskeletal Dynamics”) in Heidelberg; Posterpräsentation.

Inhaltsverzeichnis

VORVERÖFFENTLICHUNGEN	I
INHALTSVERZEICHNIS	II
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 AKTINPOLYMERISATION	2
1.2 ORGANISATION DES AKTINZYTOSKELETTS	4
1.3 REGULATION DER AKTINDYNAMIK	6
1.3.1 Kontrolle der Aktindynamik durch Aktin-bindende Proteine	6
1.3.2 Regulation der Aktindynamik durch Rho-GTPasen	8
1.4 DER ARP2/3-KOMPLEX	10
1.5 DIE WASP/WAVE-PROTEINFAMILIE	13
1.5.1 WASP und N-WASP	13
1.5.2 WAVE/Scar Proteine	16
1.5.3 Der WAVE-Komplex	17
1.6 IRSp53	19
1.7 DIE ROLLE DES ZELLULÄREN AKTINZYTOSKELETTS BEI DER	
1.8 INVASION VON BAKTERIELLEN PATHOGENEN	22
1.7.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	22
1.7.2 <i>Shigella flexneri</i>	24
1.7.3 <i>Salmonella typhimurium</i>	26
1.8 ZIEL DER DISSERTATION	28
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	30
2.1.1 Chemikalien	30
2.1.2 Zellkulturreagenzien und Plastikware	30
2.1.3 Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie	30
2.2 BAKTERIENKULTUR	30
2.2.1 Bakterienstämme	30
2.2.2 Bakterienkulturmedien und Zusätze	31
2.2.3 Bakterienkulturbedingungen	31
2.3 ZELLKULTUR	32
2.3.1 Medien und Lösungen	32
2.3.2 Verwendete Zelllinien	33
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.4.1 Plasmide	33

2.4.2	Oligonukleotide	36
2.4.3	Expressed sequence tags (EST-Klone)	36
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.4.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.4.6	Agarosegelelektrophorese	39
2.4.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	40
2.4.8	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	40
2.4.9	Ligation von DNA	41
2.4.10	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	41
2.4.11	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	42
2.4.12	TOPO-Klonierung	43
2.4.13	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.4.14	Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA	44
2.4.15	Mutagenese	44
2.4.16	DNA-Sequenzierung	44
2.4.17	Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA	45
2.4.18	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	46
2.5	BIOCHEMISCHE METHODEN	47
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.5.2	Coomassie-Färbung	48
2.5.3	Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen	49
2.6	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	49
2.6.1	Primäre Antikörper	49
2.6.2	Sekundäre Antikörper	50
2.6.3	Western Blot	50
2.6.4	Immunfärbung und Chemolumineszenz	51
2.6.5	Generierung polyklonaler Antikörper	51
2.6.6	Reinigung polyklonaler Antikörper mittels Affinitätschromatographie	52
2.6.7	Immunpräzipitation	53
2.7	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	54
2.7.1	Standardkultur	54
2.7.2	Passagieren von Zellen	54
2.7.3	Kultur auf Deckgläschen	54
2.7.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	55
2.7.5	Transfektion eukaryotischer Zellen	55
2.7.6	Herstellung von Zellextrakten	56
2.7.7	Gentamycin Protection Assay	56
2.7.8	Infektion eukaryotischer Zellen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	58
2.7.9	Infektion eukaryotischer Zellen mit <i>Salmonella typhimurium</i>	59
2.8	DIGITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE	59
2.8.1	Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen	61

2.8.2	Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen	61
3	ERGEBNISSE	63
3.1	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON GFP-KONSTRUKTEN UND ANTIKÖRPERN	63
3.1.1	Klonierung der cDNAs von murinem WAVE1, -2 und -3, von murinem IRTKS und humanem FLJ22582	63
3.1.2	Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen WAVE1, -2 und -3	64
3.1.3	WAVE1, -2 und -3 lokalisieren an der lamellipodalen Spitze von Aluminiumfluorid-behandelten B16-F1 Zellen	67
3.1.4	Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen IRSp53, IRTKS und FLJ22582	69
3.1.5	IRTKS und FLJ22582 lokalisieren an der lamellipodalen Spitze von Aluminiumfluorid-behandelten B16-F1 Zellen	72
3.1.6	IRSp53 und IRTKS interagieren mit konstitutiv aktivem Rac und Cdc42	73
3.2	DIE ROLLE VON AKTINREORGANISATION INDUZIERENDEN SIGNAL- WEGEN DER WIRTSZELLE FÜR DIE INVASION VERSCHIEDENER BAKTERIELLER PATHOGENE	76
3.2.1	Die Rolle der WAVE-Komplex-vermittelten Aktinreorganisation bei der Aufnahme von <i>Listeria monocytogenes</i>	76
3.2.1.1	Kontrolle der Gentamycin Protection Assays	77
3.2.2	Die WAVE-Komplex-Komponenten Sra-1 und WAVE2 lokalisieren an der Aufnahmestelle von <i>Listeria monocytogenes</i>	78
3.2.3	Die Bedeutung des WAVE-Komplexes und N-WASP bei der Invasion von <i>Shigella flexneri</i>	79
3.2.4	Die Rolle der WAVE-Komplex-vermittelten Aktinreorganisation bei der der Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i>	82
3.2.5	Die Arp2/3-Komplex-Lokalisation an der Aufnahmestelle von <i>Salmonella typhimurium</i> ist unabhängig vom WAVE-Komplex	86
3.2.6	Die Funktion von N-WASP bei der Invasion von <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	87
3.2.7	Die Rolle von Cdc42 bei der Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i>	88
3.2.8	Die Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i> wird über die bakteriellen Effektorproteine SopB, SopE und SopE2 vermittelt	90
3.2.9	Die Bedeutung der Signalübertragung von Cdc42 und Rac zur Aktin- polymerisation für die SopB-vermittelte Invasion von <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	92
3.2.10	SopE sowie SopE2 induzieren Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ in Cdc42 ^{flox/del} und Cdc42 ^{del/del} Zellen	95

4	DISKUSSION	99
4.1	DIE WAVE-PROTEINE LOKALISIEREN AN DER SPITZE VON LAMELLIPODIEN UND SIND KOMPONENTEN VON PROTEINKOMPLEXEN	99
4.2	IRSp53, IRTKS und FLJ22582 LOKALISIEREN AN DER LAMELLIPODIALEN SPITZE UND INTERAGIEREN MIT RAC UND CDC42	101
4.3	DIE WAVE-KOMPLEX-VERMITTELTE AKTINREORGANISATION IST ESSENTIELL FÜR DIE INTERNALIN B-VERMITTELTE INVASION VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	104
4.4	DIE INVASION VON <i>SHIGELLA FLEXNERI</i> BENÖTIGT WEDER DIE WAVE-KOMPLEX-VERMITTELTE NOCH DIE DURCH N-WASP INDUZIERT AKTINREORGANISATION	106
4.5	DIE WAVE-KOMPLEX-VERMITTELTE AKTINREORGANISATION IST NICHT ESSENTIELL FÜR DIE INVASION VON <i>SALMONELLA</i> <i>TYPHIMURIUM</i>	109
4.6	DIE ARP2/3-KOMPLEX-LOKALISATION AN DER AUFNAHMESTELLE VON <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> WIRD NICHT ÜBER DEN WAVE-KOMPLEX VERMITTELT	111
4.7	N-WASP HAT KEINE ESSENTIELLE FUNKTION BEI DER INVASION VON <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i>	112
4.8	CDC42 WIRD NICHT FÜR DIE AUFNAHME VON <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> BENÖTIGT	113
4.9	DIE INVASION VON <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> WIRD ÜBER DIE BAKTERIELLEN EFFEKTORPROTEINE SopB, SopE UND SopE2 VERMITTELT	114
4.10	DIE SopB-INDUZIERT INVASION VON <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> WIRD NICHT ÜBER CDC42- UND RAC-ABHÄNGIGE SIGNALWEGE VERMITTELT	115
4.11	CDC42 WIRD NICHT FÜR DIE SopE2-INDUZIERT FORMATION VON LAMELLIPODIEN UND ‚MEMBRANE RUFFLES‘ BENÖTIGT	117
5	ZUSAMMENFASSUNG	121
6	LITERATURVERZEICHNIS	122
7	ABKÜRZUNGEN	137
8	DANKSAGUNG	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Das Treitmühlenphänomen	3
Abbildung 1.2:	Hypothetische Darstellung der Aktinpolymerisation und der Effekte von Nukleationsfaktoren	3
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der Aktinorganisation in Lamellipodien und Filopodien	5
Abbildung 1.4:	Der Rho-GTPasen Zyklus	9
Abbildung 1.5:	Struktur des Arp2/3-Komplexes	11
Abbildung 1.6:	Modelle der Aktinnukleation durch den Arp2/3-Komplex	12
Abbildung 1.7:	Schematische Darstellung der WASP/WAVE-Proteine	13
Abbildung 1.8:	Modell der Aktivierung von N-WASP	15
Abbildung 1.9:	Schematische Darstellung der Aktivierung des WAVE-Komplexes	18
Abbildung 1.10:	Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von IRSp53	20
Abbildung 1.11:	Die N-terminalen Domänen von IRSp53-Familienmitgliedern sind konserviert	21
Abbildung 1.12:	<i>Listeria monocytogenes</i> vermittelt seine Invasion über den Zipper-Mechanismus	24
Abbildung 1.13:	<i>Shigella flexneri</i> vermittelt seine Invasion über den Trigger-Mechanismus	26
Abbildung 1.14:	<i>Salmonella typhimurium</i> vermittelt seine Invasion über den Trigger-Mechanismus	28
Tabelle 2.1:	Verwendete Zelllinien	33
Abbildung 2.1:	Plasmid-Karten der pEGFP-C1 und –N1 Fusionsvektoren	34
Tabelle 2.2:	Hergestellte und verwendete Konstrukte	35
Tabelle 2.3:	Oligonukleotide	36
Tabelle 2.4:	Verwendete / generierte primäre Antikörper	49
Tabelle 2.5:	Verwendete sekundäre Antikörper	50
Abbildung 3.1:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE2 Antiserums	64
Abbildung 3.2:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE2 Antikörpers 5502	65
Abbildung 3.3:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE1 Antikörpers 5065	65
Abbildung 3.4:	VA-13 und B16-F1 Zellen exprimieren kein WAVE1	66
Abbildung 3.5:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE3 Antikörpers 5062	66
Abbildung 3.6:	VA-13 und B16-F1 Zellen exprimieren kein WAVE3	67
Abbildung 3.7:	Lokalisation von WAVE2 in B16-F1 Zellen auf Laminin	68
Abbildung 3.8:	Lokalisation von WAVE1-GFP und GFP-WAVE3 in B16-F1 Zellen auf Laminin	68
Abbildung 3.9:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-IRSp53 Antikörpers	69
Abbildung 3.10:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-IRSp53 Antikörpers 5058	70
Abbildung 3.11:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-IRTKS Antikörpers 5498 2B	71
Abbildung 3.12:	Western Blot Analyse des polyklonalen anti-FLJ22582 Antikörpers 7170	72
Abbildung 3.13:	Lokalisation von IRTKS-GFP in B16-F1 Zellen auf Laminin	73
Abbildung 3.14:	Lokalisation von FLJ22582-GFP in B16-F1 Zellen auf Laminin	73
Abbildung 3.15:	Die kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac werden nicht mit GFP-IRSp53 und GFP-IRTKS präzipitiert	74
Abbildung 3.16:	IRSp53 und IRTKS interagieren mit den kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac	75

Abbildung 3.17: Die WAVE-Komplex-Komponente Nap1 ist essentiell für die Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> in humane VA-13 Zellen	77
Abbildung 3.18: Western Blot Analyse von Zellextrakten aus dem Gentamycin Protection Assay	78
Abbildung 3.19: Western Blot Analyse der Mock und Nap1 RNAi Zellen	78
Abbildung 3.20: Lokalisation der WAVE-Komplex-Komponenten WAVE2 und Sra-1 an der Aufnahmestelle von <i>Listeria monocytogenes</i>	79
Abbildung 3.21: Nap1 wird für die Invasion von <i>Shigella flexneri</i> in humane VA-13 Zellen nicht benötigt	80
Abbildung 3.22: N-WASP ist für die Invasion von <i>Shigella flexneri</i> nicht erforderlich	81
Abbildung 3.23: Nap1 wird für die Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i> nicht benötigt	83
Abbildung 3.24: Die durch <i>Salmonella typhimurium</i> induzierte Aktinreorganisation ist in Nap1 RNAi Zellen verändert	84
Abbildung 3.25a: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mock RNAi Zellen mit <i>Salmonella typhimurium</i>	85
Abbildung 3.25b: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mock RNAi Zellen mit <i>Salmonella typhimurium</i>	85
Abbildung 3.25c: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nap1 RNAi Zellen mit <i>Salmonella typhimurium</i>	86
Abbildung 3.26: Lokalisation der Arp2/3-Komplex-Untereinheit p16 an der Aufnahmestelle von <i>Salmonella typhimurium</i>	87
Abbildung 3.27: N-WASP wird für die Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i> nicht benötigt	88
Abbildung 3.28: Cdc42 ist für die Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i> nicht erforderlich	89
Abbildung 3.29: SopB, SopE und SopE2 sind die zentralen bakteriellen Effektoren, die die Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i> vermitteln	91
Abbildung 3.30: Die SopB-vermittelte Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i> ist unabhängig von Cdc42-,Signalling'	93
Abbildung 3.31: Die SopB-vermittelte Invasion von <i>Salmonella typhimurium</i> ist unabhängig von WAVE-Komplex-vermittelter Aktinreorganisation	94
Abbildung 3.32: sopE aus <i>Salmonella typhimurium</i> induziert die Ausbildung von Lamellipodien in Cdc42 ^{flox/del} sowie Cdc42 ^{del/del} Zellen	96
Abbildung 3.33: sopE2 aus <i>Salmonella typhimurium</i> induziert die Ausbildung von Lamellipodien in Cdc42 ^{flox/del} sowie Cdc42 ^{del/del} Zellen	97
Abbildung 3.34: Die Effektoren sopE und sopE2 aus <i>Salmonella typhimurium</i> induzieren Lamellipodienformation in Cdc42 ^{flox/del} sowie Cdc42 ^{del/del} Zellen	98
Abbildung 4.1: Hypothetische Signalwege von den bakteriellen Effektoren SopE, SopE2 und SopB aus <i>Salmonella typhimurium</i> zur Aktinpolymerisation der Wirtszelle	120

1 Einleitung

Die Zellmigration spielt eine zentrale Rolle bei diversen biologischen Vorgängen wie der Embryogenese, der Immunantwort und Wundheilung sowie der Metastasierung von Tumorzellen. Die Bewegung eukaryotischer Zellen wird durch das Zytoskelett vermittelt, das sich aus einem Netzwerk dreier Proteinfilament-Typen zusammensetzt: Intermediärfilamente sind seilartige Fasern aus langgestreckten fibrillären Proteinen, deren Hauptaufgabe darin besteht, die Zellarchitektur gegenüber mechanischen Belastungen zu stabilisieren. Die langen, soliden Zylinder der Mikrotubuli setzen sich aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren zusammen und dienen hauptsächlich der Chromosomensegregation während der Zellteilung und dem Transport von Vesikeln, Organellen und anderen Zellkomponenten in Interphase-Zellen. Das Mikrofilamentsystem besteht aus flexiblen, hochdynamischen Aktinfilamenten, die für alle Bewegungsvorgänge der Zelle sowie die Zellteilung unabdingbar sind.

Insbesondere der dynamische Aufbau des Aktinfilamentsystems stellt die Grundlage für fundamentale zelluläre Prozesse dar, bei denen die Zelle ihre Gestalt verändert, sich fortbewegt oder extrazelluläres Material mittels Phago- oder Endozytose aufnimmt (Disanza et al., 2005; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Welch und Mullins, 2002).

Außerdem nutzen diverse bakterielle Pathogene das Aktinzytoskelett, um ihre Aufnahme in normalerweise nicht-phagozytotische Zellen zu bewerkstelligen. Sie stimulieren die Reorganisation von Aktinfilamenten durch verschiedene Mechanismen: einige interagieren mit zellulären Oberflächenrezeptoren, die durch Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden den Umbau des Aktinzytoskeletts induzieren. Andere wiederum aktivieren direkt Komponenten der Aktinnukleationsmaschinerie und lösen so die Formation von für die Internalisierung wichtigen, zellulären Membranveränderungen aus (Gruenheid und Finlay, 2003; Rottner et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden diverse regulative Komponenten des Aktinzytoskeletts in Hinblick auf ihre Lokalisation in subzellulären Kompartimenten und insbesondere im Kontext der Interaktion mit verschiedenen bakteriellen Pathogenen analysiert.

1.1 Aktinpolymerisation

Die ATPase Aktin (43 kDa) ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in eukaryotischen Zellen. Es existiert in zwei Formen in der Zelle: monomer sowie filamentös. Das globuläre Aktin-Monomer (G-Aktin) kann unter physiologischen Bedingungen in einer reversiblen Reaktion zu doppelsträngigen, helikalen Filamenten (F-Aktin) polymerisieren (Pantaloni et al., 2001). G-Aktin besteht aus vier Domänen, wobei durch die spezielle Konformation von zwei der Domänen eine Bindungstasche entsteht, in der ATP sowie Magnesium mit sehr hoher Affinität gebunden werden kann (Schuler, 2001).

Aktinfilamente besitzen eine strukturelle und kinetische Polarität, d.h. sie weisen ein schnell wachsendes (+)-Ende („barbed end“) und ein langsam wachsendes (-)-Ende („pointed end“) auf (Welch und Mullins, 2002). MgATP-gebundenes G-Aktin wird am (+)-Ende in das Aktinfilament eingebaut. Dabei wird das ATP hydrolysiert und anorganisches Phosphat (P_i) freigesetzt, was zu einer Destabilisierung des F-Aktin führt. Die Affinität des ADP-gebundenen Aktin zum Filament am (+)-Ende ist im Vergleich zu ATP-gebundenem Aktin vermindert (Korn et al., 1987), und das ATP wird schnell in ADP und Orthophosphat hydrolysiert, so dass netto am (-)-Ende ADP-Aktin dissoziiert (Pollard und Borisy, 2003). Das ADP-Aktin-Monomer wird dann wiederum mit ATP beladen und zurück zum (+)-Ende transferiert, wo es erneut an das Aktinfilament polymerisiert. Das Aktin-Monomer „durchwandert“ also das Filament jeweils vom (+)- zum (-)-Ende (Wegner, 1976). Diese Erscheinung wird auch Tretmühlen-Phänomen genannt (s. Abbildung 1.1). So entsteht ein dynamischer Gleichgewichtszustand aus G-Aktin-Dissoziation und -Assoziation, bei dem es schließlich zu keinem Netto-Wachstum des Aktinfilaments mehr kommt. Die in diesem Gleichgewicht vorliegende G-Aktin-Konzentration wird kritische Konzentration (C_c) genannt und definiert sich über das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation an den Filament-Enden. Liegt die Monomer-Konzentration zwischen der kritischen Konzentration von beiden Enden, so entspricht die Anzahl der Aktin-Moleküle, die an das (+)-Ende assoziierten, der Anzahl der dissoziierenden Moleküle am (-)-Ende (Pollard, 1986).

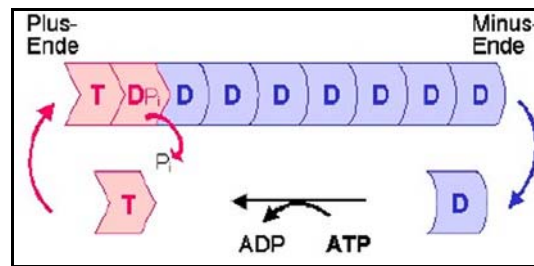


Abbildung 1.1: Das Tretmühlen-Phänomen. Das Tretmühlen-Phänomen von Aktinfilamenten spiegelt das energetische Ungleichgewicht zwischen dem Plus- und Minus-Ende wider. Die Dissoziation am Minus-Ende ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der die Wachstumsgeschwindigkeit am Plus-Ende und die Konzentration von ATP-G-Aktin kontrolliert (nach Pantaloni et al., 2001).

Spontane Aktinpolymerisation ist ein sehr langsamer Prozess (s. Abb. 1.2). Für die Neubildung eines Aktinfilaments wird ein sogenannter Nukleationskern benötigt, der aus einem Aktin-Dimer oder -Trimer besteht. Die Formation eines solchen Nukleationskerns ist thermodynamisch ungünstig, doch sobald ein Trimer vorhanden ist, lagern sich weitere Aktin-Monomere an und die Polymerisationsgeschwindigkeit nimmt rapide zu (Cooper et al., 1983; Frieden, 1983; Kreishman-Deitrick und Rosen, 2002). Die gesteigerte Polymerisationsgeschwindigkeit *in vivo* rührt von zellulären Nukleationsfaktoren wie dem Arp2/3-Komplex und dessen Aktivatoren, den Proteinen der WASP/Scar-Familie her (Machesky et al., 1994; Machesky und Insall, 1998; Machesky et al., 1999; Mullins et al., 1998). Diese Aktin-Regulatoren werden in Kapitel 1.4 und 1.5 detailliert beschrieben.

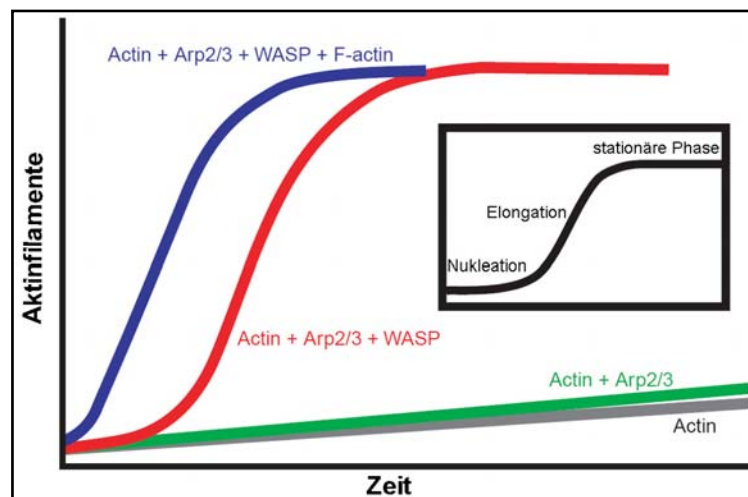


Abbildung 1.2: Hypothetische Darstellung der Aktinpolymerisation und der Effekte von Nukleationsfaktoren. Die Aktinpolymerisation gliedert sich in drei kinetische Phasen: Nukleations-, Elongations- sowie stationäre Phase (schwarzer Kasten). Die spontane Polymerisation von Aktin (grau) ist sehr langsam. Auch die Zugabe von inaktivem Nukleator (Arp2/3-Komplex; grün) bewirkt keine Beschleunigung der Filamentbildung. Nach Stimulation durch Proteine der WASP/Scar-Familie („nucleation promoting factor“; NPF) entwickelt sich der Arp2/3-Komplex zum effizienten Aktinnukleator (rot), was sich in der Reduktion der Nukleationsphase einhergehend mit der Beschleunigung des Wachstums äußert. Die Beimengung von F-Aktin bewirkt des weiteren eine Zunahme der Polymerisationsgeschwindigkeit (blau) (Kreishman-Deltrick und Rosen, 2002).

1.2 Organisation des Aktinzytoskeletts

Das Aktinzytoskelett ist ein komplexes, flexibles und dynamisches Netzwerk, das bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Es ist u.a. in die Zellmotilität, die Erhaltung der zellulären Gestalt, die Anheftung der Zelle und ihre Interaktion mit der extrazellulären Matrix involviert. Außerdem ist es an der Zellteilung sowie endo- und phagozytotischen Prozessen beteiligt (da Costa et al., 2003). Um diese verschiedenen Funktionen in der Zelle ausüben zu können, weist das Aktinzytoskelett eine Vielzahl an dynamischen Strukturen auf.

Zu den meist-zitierten Aktinstrukturen gehören Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien (Small et al., 1999), wobei die beiden zuletzt genannten zu den protrusiven (= den Zellvorschub bewirkenden) Strukturen gehören.

Stressfasern sind lange, dichte Bündel aus parallel angeordneten Aktinfilamenten. Durch eine bipolare Anordnung von Aktin und Myosin II sind sie in der Lage, zu kontrahieren und die Spannung der Zelle aufrecht zu erhalten (Small et al., 1999). Für ihre Entstehung werden sogenannte Fokalkontakte benötigt. Dies sind transmembrane Verbindungen, die die Zelle an der extrazellulären Matrix verankern (Izzard und Lochner, 1976; Izzard und Lochner, 1980; Parsons et al., 2000).

Als **Lamellipodium** bezeichnet man den flachen, breiten Leitsaum an der vorderen Front einer motilen Zelle (Abercrombie et al., 1970a; Abercrombie et al., 1971). Es zeichnet sich durch eine relativ konstante Breite von $\sim 1\text{-}5\ \mu\text{m}$ und eine Höhe von ca. 200 nm aus (Small und Resch, 2005; Small et al., 2002). Die Aktinfilamente innerhalb des Lamellipodiums liegen in einem locker verbundenen, diagonalen oder verzweigtem Netzwerk vor (Small et al., 2002; Svitkina und Borisy, 1999). Sie sind mit ihren schnell wachsenden (+)-Enden in Richtung der Zellmembran orientiert, so dass durch die Polymerisation von Aktin-Molekülen in das Filament der Vorschub der Zellmembran bewirkt wird (Small et al., 1978; Tilney et al., 1981). Durch die Bildung von fokalen Komplexen mit der extrazellulären Matrix kann das Lamellipodium am Substrat adhäreren und so die benötigte Zugkraft für den Zellvorschub aufbringen (Kaverina et al., 2002). Außerdem können Lamellipodien in Form von gekräuselten Membranaufwerfungen („membrane ruffles“) über die Zelloberseite nach hinten zurück wandern (Abercrombie et al., 1970b). Im Leitsaum der Zelle können zudem sogenannte „microspikes“ eingebettet sein. Es handelt sich hierbei um kurze, dünne Filamentbündel, die lateral im Lamellipodium wandern können und als Vorläufer von Filopodien angesehen werden (Small et al., 2002; s. Abb. 1.3).

Filopodien sind fingerartige Ausläufer der Zellmembran (s. Abb. 1.3). Sie setzen sich aus langen Aktinfilamenten zusammen, die parallel angeordnet und mit Hilfe von Aktin-bindenden Proteinen wie z.B. Fascin gebündelt sind (Bartles, 2000; Small, 1988). Ihre (+)-Enden sind in die Richtung des Vorschubs orientiert, d.h. die Polymerisation findet an den Spitzen dieser Filamente statt (Mallavarapu und Mitchison, 1999). Filopodien dienen möglicherweise als ‚sensorisches Organ‘, das die Extrazelluläre Matrix sowie die Oberfläche benachbarter Zellen ‚abtastet‘ (Wood und Martin, 2002). Der genaue Entstehungsmechanismus von Filopodien ist noch nicht geklärt. Svitkina et al. vertreten die Vorstellung, dass Filopodien durch die Reorganisation von Lamellipodien entstehen. Doch die Aktinpolymerisation in Lamellipodien wird durch den Arp2/3-Komplex (s.u.) vermittelt, wohingegen dieser Proteinkomplex in den parallel angeordneten Aktinfilamentbündeln der Filopodien fehlt (Svitkina und Borisy, 1999; Svitkina et al., 2003).

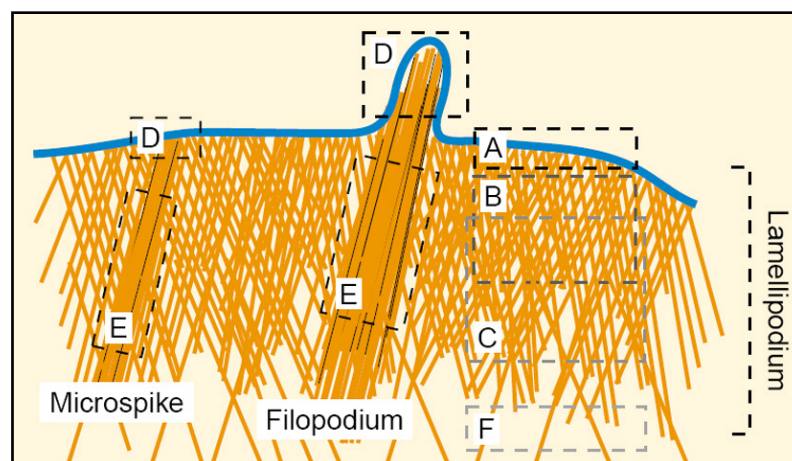


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Aktinorganisation in Lamellipodien und Filopodien. (A) Gezeigt sind die lamellipodiale Spitze, (B) das Aktinnetzwerk, (C) die Hauptregion des Aktinabbaus, (D) die Spitze des Filopodiums / Mikrospikes, (E) Aktinfilamentbündel (F) F-Aktin des Zytoplasmas (aus Small et al., 2002).

Aufgrund seiner zentralen Rolle und seiner komplexen Regulation bietet das Aktinzytoskelett vielerlei Angriffspunkte. Durch Mutationen oder andere Defekte des Mikrofilamentsystems und übergeordneter Mechanismen wird eine Vielzahl von Pathologien ausgelöst. Des Weiteren haben zahlreiche mikrobielle Pathogene während der langen Ko-Existenz mit dem Wirt Methoden entwickelt, mit denen sie zu ihren Gunsten das Aktinzytoskelett der Wirtszelle ausnutzen. Daher ist es von großer Bedeutsamkeit, das Aktinzytoskelett sowie die damit zusammenhängenden Signalwege und ihre molekularen Faktoren bis ins Detail zu analysieren.

1.3 Regulation der Aktindynamik

1.3.1 Kontrolle der Aktindynamik durch Aktin-bindende Proteine

Der dynamische Aufbau und die räumliche Organisation von Aktinfilamenten wird durch ein großes Repertoire von Aktin-bindenden Proteinen reguliert (Disanza et al., 2005). Diese Proteine lassen sich in diverse Gruppen einteilen: Proteine, die (1) die Nukleation von Aktin begünstigen, (2) die Depolymerisation der Filamente steuern, (3) mit monomerem Aktin assoziieren und (4) die Enden der Aktinfilamente bedecken.

ADF(*Actin depolymerising factor*)/**Cofilin** besitzt Bindekapazitäten für sowohl monomeres als auch F-Aktin und beschleunigt die Depolymerisation des Aktinfilaments am (-)-Ende (Blanchoin et al., 2000b). Neben der Funktion als Depolymerisationsfaktor besitzt es auch eine Fragmentierungsaktivität und kann so unter bestimmten Bedingungen die Konzentration an (+)-Enden für die Aktinpolymerisation erhöhen (Paavilainen et al., 2004).

Profilin bindet monomeres Aktin mit hoher Affinität und katalysiert dabei den Austausch von ADP zu ATP an G-Aktin (Perelroizen et al., 1996). Im Zusammenspiel mit ADF/Cofilin verstärkt es die Geschwindigkeit des Filament-Umbaus im Tretmühlenmechanismus, da es ATP-gebundenes Aktin an das (+)-Ende anfügt, während ADF/Cofilin für die Dissoziation am (-)-Ende sorgt (dos Remedios et al., 2003). Außerdem verhindert es die Hydrolyse des an Aktin gebundenen ATPs, so dass die Aktin-Monomere in einem thermodynamisch günstigen Zustand für die Polymerisation vorliegen.

Thymosin β_4 bindet bevorzugt an ATP-G-Aktin. Auf diese Weise erzeugt es ein Reservoir an ATP-gebundenen Aktin-Molekülen für die spätere Polymerisation (Carlier et al., 1993; Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Hertzog et al., 2004).

Fragmentierungsproteine binden seitlich an F-Aktin und erzeugen Aktinfilamentbrüche. **Gelsolin** schneidet nach seiner Aktivierung durch z.B. Ca^{2+} das Filament in zwei Stücke (Kwiatkowski, 1999). Danach verbleibt das Gelsolin-Molekül am (+)-Ende des neu entstandenen Filaments und bedeckt es (= *capping*) (Cooper und Schafer, 2000). **Villin** verfügt neben seiner Fragmentierungsfunktion über eine F-Aktin-Bündelungsaktivität (Pope et al., 1994).

Capping-Proteine können Aktinfilamente am (+)- sowie am (-)-Ende bedecken, was die Polymerisation bzw. die Depolymerisation verhindert. Wird das (+)-Ende bedeckt, so kann eine Dissoziation von Aktin-Molekülen am (-)-Ende erfolgen, welche wiederum an andere, nicht mit Capping-Proteinen bedeckte (+)-Enden polymerisieren können (Carlier und Pantaloni, 1997; Schafer und Cooper, 1995). Auf diese Art und Weise dienen Capping-

Proteine dem räumlich begrenzten und signalabhängigen Wachstum von Aktinfilamenten (Disanza et al., 2005).

Die *de novo* Nukleation von Aktin wird z.B. durch den **Arp2/3-Komplex** katalysiert. Dieser Proteinkomplex sowie die für seine Aktivierung nötigen Proteine werden in Kapitel 1.4 und 1.5 detailliert beschrieben.

Vor kurzem wurden aber auch Arp2/3-Komplex-unabhängige Wege der Aktinnukleation entdeckt. Hierbei wurde das Interesse an der Proteinfamilie der **Formine** geweckt. Formine sind modulare Proteine, die spezielle Domänen und funktionelle Motive enthalten und bereits in einer Vielzahl von Spezies (von niederen Organismen wie Hefe oder *Dictyostelium* bis hin zum Säuger) nachgewiesen wurden (Waller und Alberts, 2003). Das charakteristische Merkmal dieser Proteine ist die FH2 (Formin Homologie-2)-Domäne, die innerhalb der Proteinfamilie hochkonserviert ist. *In vitro*-Daten zeigten, dass diese Domäne für die Aktinnukleation erforderlich und auch ausreichend ist, indem es die Stabilisierung eines für die Nukleation nötigen Aktin-Dimers vermittelt (Li und Higgs, 2003; Pring et al., 2003; Pruyne et al., 2002). Auch verbleibt die FH2-Domäne kontinuierlich am (+)-Ende des wachsenden Filaments und verändert die Dynamik der Aktinpolymerisation höchstwahrscheinlich auf folgende Art und Weise (Higgs, 2005):

- (i) Beschleunigung der Aktinnukleation
- (ii) Veränderung der Filamentverlängerungs-/depolymerisationsgeschwindigkeitsrate
- (iii) Verhinderung des ‚Cappings‘ von (+)-Enden durch Capping-Proteine

Die FH2-Domäne wird üblicherweise N-terminal von einer FH1-Domäne flankiert. Die FH1-Domäne ist reich an Prolinen und bindet Profilin, SH3-Domänen enthaltende Proteine und WW-Domänen (Zigmond, 2004). Außerhalb der FH1-FH2-Region verringert sich die Aminosäuresequenzähnlichkeit der Formine, was diverse Mechanismen der Regulation und der zellulären Lokalisation vermuten lässt. Einige Formine werden z.B. durch Autoinhibition reguliert, die durch die Interaktion bestimmter Domänen ausgelöst wird und durch die Bindung von aktiven Rho-GTPasen wieder aufgehoben werden kann (Dong et al., 2003; Gasteier et al., 2003; Olson, 2003).

Ein weiterer Aktinnukleator, **Spire**, weist keine Sequenzhomologie mit Forminen oder dem Arp2/3-Komplex auf, enthält aber Aktin-bindende Domänen, die bereits in Regulatoren des Arp2/3-Komplexes wie z.B. N-WASP gefunden wurden (Kerkhoff et al., 2001; Otto et al., 2000; Quinlan et al., 2005). Dabei handelt es sich um vier WH2 (WASP Homologie2)-

ähnliche Domänen und eine ‚Linker‘-Region mit Aktin-Bindungsfähigkeit. Die WH2-Domänen rekrutieren ATP-Aktin-Monomere und generieren so ein neues, einzelsträngiges Aktin-Tetramer, das als Nukleationskern für die Aktinpolymerisation zu dienen scheint. Die C-terminal liegenden WH2-Domänen und die ‚Linker‘-Region initiieren diesen Prozess und bedecken das (-)-Ende des entstehenden Filaments, das so gegen Depolymerisation geschützt ist. Spire generiert im Gegensatz zum Arp2/3-Komplex nur unverzweigte Filamente (Baum und Kunda, 2005; Schuldt, 2005).

1.3.2 Regulation der Aktindynamik durch Rho-GTPasen

Mit der Zellmigration wird eine große Anzahl von Signalmolekülen in Zusammenhang gebracht. U.a. sind Phospholipasen, Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen in die Kontrolle der Zellwanderung involviert. Die biochemischen Signalwege, die größte Relevanz für die Zellmigration haben, werden jedoch hauptsächlich durch eine spezielle Proteinfamilie reguliert: die Rho-GTPasen.

Rho-GTPasen gehören zu der Familie der Ras-GTPasen. Sie haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 20-40 kDa und etliche von diesen werden ubiquitär exprimiert. Bis dato wurden 22 Gene in Säugern identifiziert, in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hingegen wurden lediglich 5 Rho-Gene ermittelt (Aspenstrom et al., 2004; Jaffe und Hall, 2005). Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter. In aktivem Zustand haben sie GTP gebunden, durch Hydrolyse des GTP zu GDP wechseln sie in die inaktive Form (s. Abb. 1.4). Dieser GDP-GTP-Zyklus wird dabei durch unterschiedliche Moleküle reguliert. Guanin-Austauschfaktoren (‚guanine nucleotide exchange factors‘; GEFs) begünstigen den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP und somit die Aktivierung, während GTPase aktivierende Proteine (GAPs) die hydrolytische Aktivität der GTPase verstärken und daher die inaktive Konformation fördern. Zusätzlich können Guanin-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) die Dissoziation des GDP blockieren. In ruhenden Zellen liegen die Rho-GTPasen im inaktiven Zustand (komplexiert mit GDIs) vor, nach Stimulation der Zelle werden sie aus diesem Komplex entlassen und können mit Hilfe ihres isoprenylierten C-Terminus in der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran lokalisieren (Olofsson, 1999; Robbe et al., 2003). Dort können sie dann von GEFs aktiviert werden.

Rho-GTPasen binden in ihrem aktiven Zustand an diverse Effektormoleküle und induzieren so spezifische zelluläre Antworten auf externe Stimuli (Bishop und Hall, 2000).

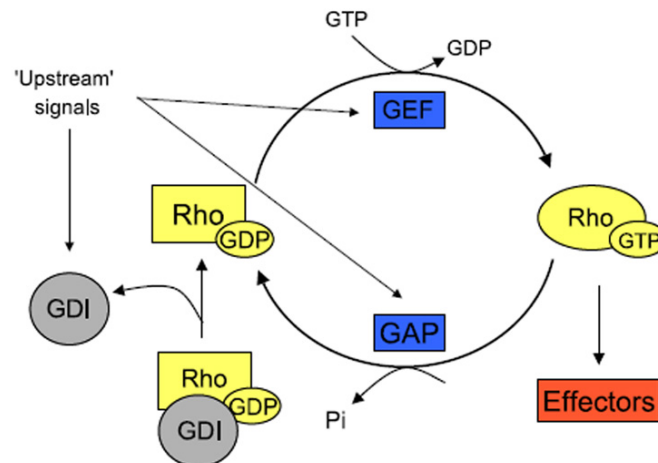


Abbildung 1.4: Der Rho-GTPasen Zyklus. Rho-GTPasen wechseln zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und dem aktiven, GTP-gebundenem Zustand. Der Zyklus wird hauptsächlich durch Guanin-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase aktivierende Proteine (GAPs) und Guanin-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) reguliert. In der aktiven Form können Rho-GTPasen an Effektormoleküle wie z.B. Kinasen binden (Raftopoulou und Hall, 2004).

Der Aufbau und die Organisation des Aktinzytoskeletts werden insbesondere durch die Rho-GTPasen Cdc42, Rac1 und Rho reguliert. Des Weiteren sind sie in Zelladhäsion, Ausbildung und Erhaltung der Zellpolarität, Endozytose, Vesikeltransport, Zelldifferenzierung und Transkription involviert (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Nobes und Hall, 1999).

Die drei Rho-GTPasen unterliegen einer gewissen Hierarchie. Cdc42 kann zur Aktivierung von Rac1 führen, und beide Proteine können Rho inhibieren (Nobes und Hall, 1995; Sander et al., 1999).

Rho reguliert die Bildung kontraktile Aktin-Myosin-Filamente (Stressfasern) und wird für die Formation und Erhaltung fokaler Adhäsionen benötigt (Nobes und Hall, 1995; Ridley und Hall, 1992).

Rac kann durch Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF (epidermal growth factor), Insulin und PDGF (platelet derived growth factor) aktiviert werden und induziert durch Aktinpolymerisation an der vorderen Zellfront einer motilen Zelle die Bildung von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ (Ridley et al., 1992). Außerdem führt die Produktion des Phosphatidylinositol 3-Phosphats $PI(3,4,5)P_3$ zu einem Anstieg von GTP-gebundenem, aktiven Rac1 in vielen Zelltypen, und die Überexpression von konstitutiv-aktiver PI3-Kinase (welche PIP_3 produziert) induziert die Bildung Rac-abhängiger Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ (Hawkins et al., 1995; Reif et al., 1996).

Cdc42 induziert Filopodien und kann über Rac-Aktivierung ebenfalls zur Formation von Lamellipodien führen. Wird die Rac-Aktivierung durch einen Inhibitor unterdrückt, so induziert Cdc42 dementsprechend nur die Bildung von Filopodien. Umgekehrt verhindert die Mikroinjektion von dominant-negativem Cdc42 die durch Bradykinin induzierte Formation

von Filopodien in Swiss3T3-Zellen und Fibroblasten (Kozma et al., 1995). Vor kurzem wurde gezeigt, dass $Cdc42^{-/-}$ Zellen aber durchaus noch fähig sind, Filopodien zu bilden und dass dominant-negatives Cdc42 kein spezifischer Inhibitor für das Wildtyp-Protein ist, sondern vermutlich mit einer ganzen Reihe von Rho-GTPasen interferiert (Czuchra et al., 2005).

Außerdem können Rac und Cdc42 in ähnlicher Weise wie Rho die Ausbildung von fokalen Komplexen innerhalb von Lamellipodien und Filopodien induzieren (Nobes und Hall, 1995).

1.4 Der Arp2/3-Komplex

Die spontane Nukleation von Aktin ist ein thermodynamisch ungünstiger und relativ langsamer Prozess (s. Kapitel 1.1). Durch die Entdeckung und funktionelle Analyse des Arp2/3-Komplexes lässt sich inzwischen die rapide *in vivo*-Polymerisation von G-Aktin zu Filamenten erklären.

Der Arp2/3-Komplex (220 kDa) besteht aus sieben konservierten Polypeptiden: Arp2 und Arp3 (Actin related protein') sowie den nach dem entsprechenden Molekulargewicht bei Säugern benannten Untereinheiten p16, p20, p21, p34 und p40. Aufgrund der starken strukturellen Homologie von Arp2 und Arp3 zu Aktin geht man davon aus, dass der Komplex durch die Zusammenlagerung dieser beiden Proteine ein Aktin-Dimer nachahmt, welches stabiler als ein Aktin-Dimer ist und somit eine Basis für die Nukleation und rapide Aktinpolymerisation schafft (Kelleher et al., 1995). Der Komplex lokalisiert dementsprechend in motilen Bereichen einer Zelle (z.B. im Lamellipodium) sowie den Aktinschweifenden von sich durch die Zelle bewegendes Vesikeln und Pathogenen (Higgs und Pollard, 2001; Mullins et al., 1997; Welch et al., 1997a; Welch et al., 1997b).

Die basale Aktivität des Arp2/3-Komplexes ist sehr gering, wie *in vitro*-Experimente zeigten (Carlier et al., 2003; Kreishman-Deltrick und Rosen, 2002; Pollard und Borisy, 2003; s. auch Abb. 1.2). Erst die Aktivierung durch sogenannte 'Nucleation Promoting Factors' (NPFs) führt zur Initiierung seiner Aktinpolymerisationsfähigkeit. Zu den bekanntesten zellulären NPFs gehören die Proteine der WASP/WAVE-Familie (s. Kapitel 1.5). Im Vergleich zu diesen Proteinen ist Cortactin ein eher schwacher Aktivator. Es bindet mit mikromolekularer Affinität an den Arp2/3-Komplex sowie an F-Aktin und stabilisiert insbesondere die durch den Arp2/3-Komplex hervorgerufenen Aktinfilament-Verzweigungen (Urano et al., 2001; Weaver et al., 2001; Weed et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass es über seinen C-Terminus an N-WASP binden und so die N-WASP-vermittelte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes fördern kann (Kowalski et al., 2005; Weaver et al., 2002).

Neben diesen eukaryotischen Proteinen zählen auch bakterielle Oberflächenproteine wie ActA aus *Listeria monocytogenes* und RickA aus *Rickettsia conorii* zu den Arp2/3-Komplex-Aktivatoren. Sie besitzen strukturelle Homologien zu zellulären NPFs und nutzen so die Aktinnukleationsmaschinerie der Wirtszelle, um sich innerhalb der Zelle fortzubewegen (Boujemaa-Paterski et al., 2001; Gouin et al., 2004; Pizarro-Cerda und Cossart, 2006; Portnoy et al., 2002; Rottner et al., 2004).

Die C-terminale CA-Region ist in allen NPFs konserviert. Sie besteht aus einer kurzen Abfolge von basischen Aminosäuren (Cofilin-homolog; C) gefolgt von einer Sequenz aus sauren Aminosäuren („acidic“; A). Diese Region bindet an vier Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes, doch sie ist nicht ausreichend, um den Komplex zu aktivieren (Welch und Mullins, 2002; Zalevsky et al., 2001). Für die Aktivierung benötigen die NPFs neben der CA-Region ein weiteres Modul, das Aktin binden kann. Die Verprolin-ähnliche Region (V) liegt N-terminal neben der CA-Region. Durch die Bildung eines ternären Komplexes (Arp2/3-Komplex – NPF – G-Aktin) wird vermutlich eine Konformationsänderung innerhalb des Arp2/3-Komplexes induziert, die die Bildung eines Nukleationskerns im Zusammenspiel mit dem involvierten G-Aktin zur Folge hat (Robinson et al., 2001). Die Auflösung der Komplex-Struktur unterstützt diese Hypothese. Man geht davon aus, dass durch die Interaktion mit den NPFs die inaktive, offene Form des Komplexes in eine aktive Konformation überführt wird, in der Arp2 und Arp3 durch die räumliche Nähe zueinander ein Heterodimer bilden und einem freien (+)-Filamentende ähneln (s. Abb. 1.5; Robinson et al., 2001).

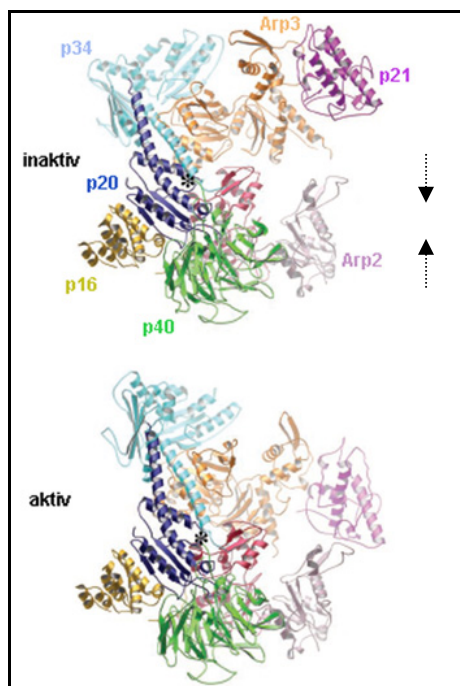


Abbildung 1.5: Struktur des Arp2/3-Komplexes. Es sind die Kristallstruktur der inaktiven Form (oben) und die hypothetisierte aktive Form durch Konformationsänderung (Pfeile) des Komplexes abgebildet (Robinson et al., 2001; modifiziert).

Außerdem führt die Bindungsaktivität des Arp2/3-Komplexes an F-Aktin zur maximalen Aktivierung, die vermutlich auch die ATP-Hydrolyse durch Arp2 und/oder Arp3 involviert (Dayel und Mullins, 2004; Gournier et al., 2001; Machesky et al., 1999; Marchand et al., 2001; Welch und Mullins, 2002; Zalevsky et al., 2001).

Der Arp2/3-Komplex verfügt zusätzlich über die Fähigkeit, Aktinfilamente in einer Y-Anordnung mit einem Winkel von 70° quer zu vernetzen (Blanchoin et al., 2000a; Mullins et al., 1998). Auf welche Art und Weise der Komplex mit F-Aktin interagiert und die Quervernetzung induziert, ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Es bestehen zwei Hypothesen zu dieser Thematik (s. Abb. 1.6):

Im Modell der dendritischen Nukleation bindet der Arp2/3-Komplex nach Aktivierung durch NPFs und Interaktion mit bereits bestehenden Aktinfilamenten an die Seite von F-Aktin. Ausgehend von diesem ‚Mutterfilament‘ nukleiert der Arp2/3-Komplex ein ‚Tochterfilament‘ (Amann und Pollard, 2001; Machesky et al., 1999; Mullins et al., 1998; Pollard et al., 2000).

Beim Modell des ‚barbed end branching‘ (Verzweigung der (+)-Enden) bindet der Arp2/3-Komplex an das schnell wachsende(+) -Ende eines ‚Mutterfilaments‘ und induziert eine Verzweigung des bestehenden Filaments in zwei gleich lange ‚Tochterfilamente‘ (Pantaloni et al., 2000; Pantaloni et al., 2001).

Beide Modelle werden durch kinetische Daten und mikroskopische Analysen unterstützt und involvieren die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch NPFs und F-Aktin (Blanchoin et al., 2000a; Egile et al., 2005).

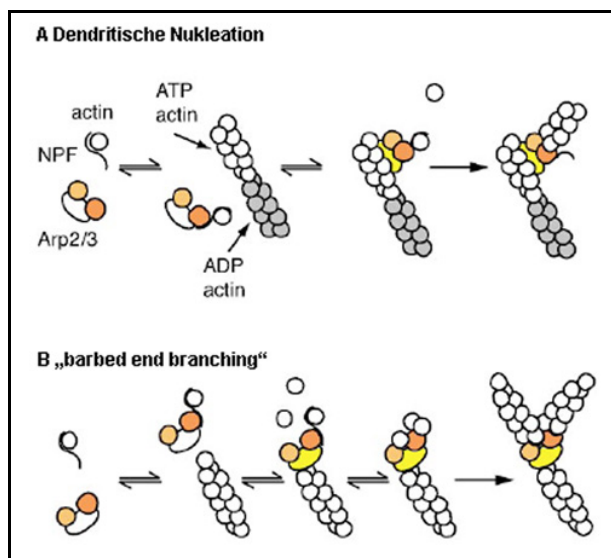


Abbildung 1.6: Modelle der Aktinnukleation durch den Arp2/3-Komplex. (A) Der mittels NPFs aktivierte Arp2/3-Komplex bindet an die Seite eines bereits existierenden ‚Mutterfilaments‘; Arp2 und Arp3 bilden in diesem Modell die ersten beiden Untereinheiten des neuen ‚Tochterfilaments‘. (B) Der aktivierte Arp2/3-Komplex bindet an das (+)-Ende eines bestehenden Filaments; Arp2 und Arp3 agieren jeweils als die erste Untereinheit zweier neuer Filamente (Nach Welch und Mullins, 2002).

1.5 Die WASP/WAVE-Proteinfamilie

Die Proteine der WASP/Scar-Familie sind die prominentesten und potentesten Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes. Gleichzeitig können sie Signale von den kleinen Rho-GTPasen Rac und Cdc42 sowie von anderen Molekülen (z.B. PIP_2) und Adapterproteinen (z.B. SH3-Domänen enthaltenden Proteinen wie Nck) detektieren. Durch die Weiterleitung dieser Signale regulieren die WASP/Scar-Proteine auf komplexe Art die durch den Arp2/3-Komplex katalysierte Aktinpolymerisation (Disanza et al., 2005; Stradal et al., 2004; Welch und Mullins, 2002).

Die Module und Regionen aller WASP/Scar-Proteine sind in ähnlicher Weise organisiert (s. Abb. 1.7). Sie besitzen eine konservierte, C-terminale Effektordomäne (VCA), über die die Bindung an den Arp2/3-Komplex und Aktin vermittelt wird und die ausreichend ist, um den Arp2/3-Komplex zu aktivieren. Der N-Terminus hingegen divergiert zwischen WASP/N-WASP und den WAVE/Scar-Proteinen und ist für die Interaktion mit anderen Proteinen und Signalmolekülen sowie die Regulation der C-terminalen Domäne verantwortlich (Machesky und Insall, 1998; Marchand et al., 2001; Miki et al., 1998a; Panchal et al., 2003).

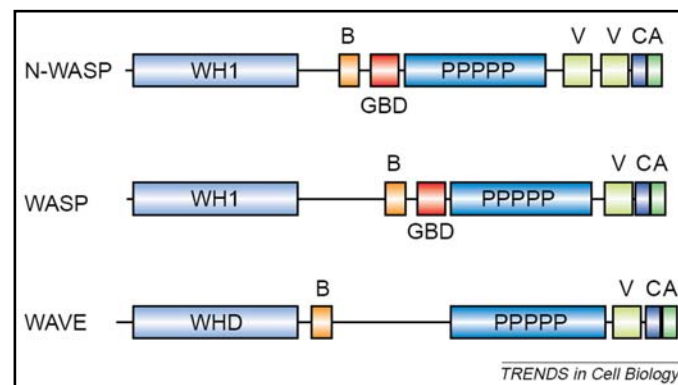


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der WASP/WAVE-Proteine. Gezeigt sind die verschiedenen Protein-Domänen und -Regionen. Die WASP-Homologie 1 (**WH1**)-Domäne ist in WASP und N-WASP konserviert. WAVE-Proteinen fehlt die WH1-Domäne, stattdessen haben sie eine WAVE-Homologie-Domäne (**WHD**). Die basische Region (**B**) vermittelt die Bindung an Phospholipide (PIP_2 im Falle von WASP/N-WASP, PIP_3 im Falle von WAVE2). Über die GTPase-Binde-Domäne (**GBD**) können WASP und N-WASP direkt mit GTP-beladenem, aktiven Cdc42 interagieren. Die Prolinreiche Region (**PPPPP**) enthält Bindemotive für SH3-Domänen-enthaltende Proteine und Profilin. Das VCA-Modul (V= Verprolin-Homologie; C=Cofilin-Homologie; A= ‚acidic‘) initiiert das Wachstum neuer Aktinfilamente, in dem es Aktin-Monomere und den Arp2/3-Komplex in räumliche Nähe bringt (Stradal et al., 2004).

1.5.1 WASP und N-WASP

WASP wurde 1994 als das Gen-Produkt identifiziert, dessen Mutation das Wiskott Aldrich-Syndrom zur Folge hat. Bei dieser X-chromosomal vererbten Krankheit handelt es sich um einen Immundefekt, bei dem die Funktion und Motilität von Blutplättchen und Leukozyten

gestört ist (Derry et al., 1994; Ochs et al., 1980). Die Expression von WASP beschränkt sich demgemäss auf das hämatopoetische System.

Neurales WASP (N-WASP) weist eine 50-%ige Sequenzhomologie zu WASP auf und wurde ursprünglich als Interaktionspartner eines SH3-Domänen-enthaltenden Proteins in Rattenhirn entdeckt (Miki et al., 1996; Miura et al., 1996). Es wird ubiquitär exprimiert, ist aber besonders stark in neuronalem Gewebe angereichert (Fukuoka et al., 1997).

Beide Proteine zeichnen sich durch einen konservierten Domänen-Aufbau aus (s. Abb. 1.7). Der C-Terminus besteht aus einem Modul, das für die Bindung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes verantwortlich und ausreichend ist. Das Modul setzt sich wie oben beschrieben aus einer VCA-Domäne zusammen, wobei N-WASP das einzige WASP/Scar-Protein ist, das zwei V-Domänen (VVCA) besitzt. Vermutlich deshalb ist die Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinpolymerisationsaktivität von N-WASP verstärkt (Yamaguchi et al., 2000; Yamaguchi et al., 2002).

Das VCA-Modul wird in N-terminale Richtung von einer Prolinreichen Sequenz gefolgt. Über die in der Sequenz enthaltenen Polyproline kann eine große Anzahl von SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen sowie Profilin gebunden werden (Carlier et al., 2000; Fukuoka et al., 2001; Rohatgi et al., 2001; Suetsugu et al., 1998; Yang et al., 2000; Yasar et al., 2002).

Die GTPase-Binde-Domäne (GBD) enthält ein CRIB-Motiv (Cdc42 and Rac interactive binding'), über das die kleine Rho-GTPase Cdc42 gebunden werden kann (Higgs und Pollard, 2000; Rohatgi et al., 2000). Neben der GTPase-Binde-Domäne befindet sich eine Abfolge von basischen Aminosäuren (B), die mit dem Phospholipid PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) interagiert. Diese basische Region und das CRIB-Motiv stellen wichtige regulatorische Interaktionsoberflächen von WASP und N-WASP dar. Sie interagieren mit der C-terminalen VCA-Region und führen so zur Autoinhibition der Moleküle. Diese Autoinhibition wird erst durch Interaktion der Proteine mit Cdc42 und PIP₂ aufgehoben (Kim et al., 2000; Prehoda et al., 2000; Rohatgi et al., 2000). Abbildung 1.8 zeigt eine schematische Darstellung der Aktivierung von N-WASP.

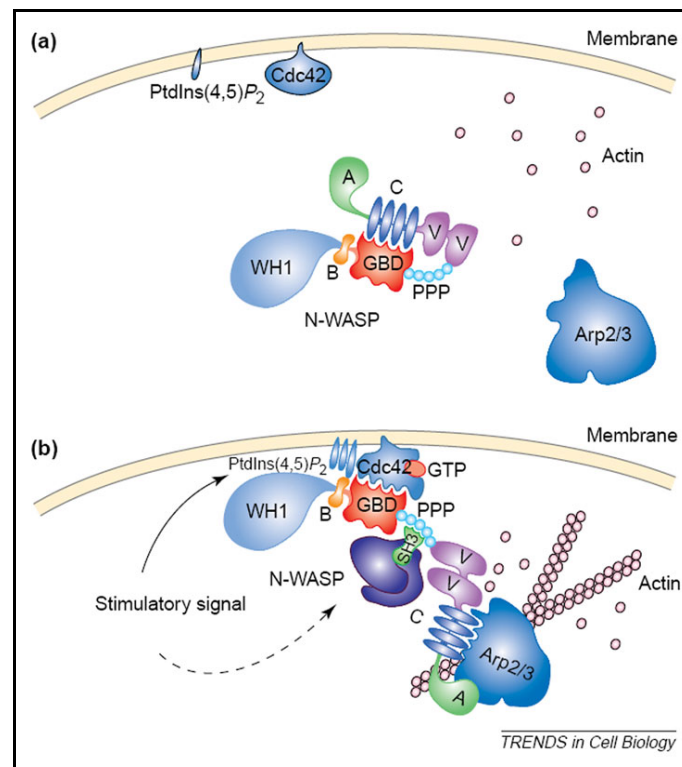


Abbildung 1.8 : Modell der Aktivierung von N-WASP. (a) In ruhenden Zellen liegen N-WASP und WASP in einer autoinhibierten Konformation vor, da die GTPase-Bindungsdomäne (GBD) mit dem C-Terminale VCA-Modul interagieren. (b) Die Stimulation der Zellen führt zu einem Anstieg der Produktion von Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP₂) und der Aktivierung von Cdc42. Die Bindung von PIP₂ und Cdc42 an die basische Region und die GBD von N-WASP verursacht eine Konformationsänderung, die in der Freisetzung des C-Terminus resultiert, so dass die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes ermöglicht wird. Zusätzlich unterstützt die Interaktion mit SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen und die posttranslationale Modifikation durch z.B. Phosphorylierung die Modulation der Aktivität von N-WASP (A, saure Region; B, basische Region; C, Cofilin-Homologie-Domäne; PPP, Prolinreiche Region; V, Verprolin-Homologie-Domäne; WH1, WASP-Homologie-Domäne) (nach Stradal et al., 2004).

Die ersten, N-terminalen 150 Aminosäuren von WASP und N-WASP umfassen die WH1-Domäne, welche der EVH1-Domäne [Ena (,Drosophila enabled')/VASP (,vasodilator-stimulated phosphoprotein')-Homologie 1] von Ena/VASP-Proteinen ähnlich ist. Ein Großteil der das Wiskott-Aldrich-Syndrom verursachenden Mutationen liegt in diesem Bereich (Imai et al., 2003). Außerdem werden über die WH1-Domäne diverse WIP-(,WASP interacting protein')-Proteine wie WIP, CR16 und WICH gebunden (Kato et al., 2002; Ramesh et al., 1997). So wurde gezeigt, dass N-WASP und WASP im Gegensatz zu der bisherigen Annahme nicht als einzelnes Molekül im Zytoplasma vorliegen, sondern im Komplex mit WIP-Proteinen (Ho et al., 2001). Des Weiteren wurde kürzlich ein neues Protein identifiziert (Toc1 [,Transducer of Cdc42-dependent actin assembly']), das für die vollständige, Cdc42-induzierte Aktivierung des WIP-WASP-Komplexes benötigt wird (Ho et al., 2004).

Aufgrund der stetig wachsenden Anzahl von Bindungspartnern spielen WASP und N-WASP in einer Vielzahl Aktin-abhängiger Prozesse eine zentrale Rolle. Z.B. ist die durch erhöhte

PIP₂- und Phosphotyrosin-Pegel induzierte Bewegung von endosomalen Vesikeln zur Gänze sowie die endozytotische Internalisierung von EGF zum Teil von N-WASP abhängig (Benesch et al., 2002; Benesch et al., 2005). Ferner führt N-WASP-Defizienz zu einer reduzierten Akkumulation von Aktin und dem Arp2/3-Komplex an Stellen der Invagination und Abschnürung von ‚Clathrin coated pits‘ (Benesch et al., 2005). Außerdem benötigen Pathogene wie das gram-negative Bakterium *Shigella flexneri* N-WASP für ihre intrazelluläre Fortbewegung (Lommel et al., 2001). Gleichermäßen ist die durch Enteropathogene *E.coli* (EPEC) und Enterohaemorrhage *E.coli* (EHEC) induzierte Bildung sogenannter Aktin-‚Pedestals‘, auf denen diese Pathogene sich extrazellulär über die Plasmamembran der infizierten Wirtszellen fortbewegen, abhängig von der Rekrutierung und Aktivierung von N-WASP (Gruenheid und Finlay, 2003; Lommel et al., 2004; Lommel et al., 2001).

1.5.2 WAVE/Scar Proteine

1998 beschrieben Bear et al. ein Gen, das für die Aktinreorganisation von *Dictyostelium discoideum* während der durch zyklisches AMP induzierten chemotaktischen Bewegung essentiell ist und bezeichneten es als Scar (‚Suppressor of cAMP activated receptor‘) (Bear et al., 1998). In Säugerzellen wurde kurze Zeit später ein Scar-homologes Protein mit einer zu N-WASP/WASP verwandten Aktin-bindenden V-Domäne entdeckt und WAVE (‚WASP-family Verprolin-homologous‘) genannt (Miki et al., 1998b). Neben diesem WAVE (WAVE1) wurden zwei weitere WAVE-Isoformen (WAVE2 und WAVE3) in Säugern beschrieben (Nozumi et al., 2003; Suetsugu et al., 1999). Die Expression von WAVE1 und WAVE3 beschränkt sich hauptsächlich auf das Gehirn, während WAVE2 ubiquitär exprimiert wird (Sossey-Alaoui et al., 2003).

Die WAVE/Scar-Proteine sind C-terminal homolog zu WASP und N-WASP (s. Abb. 1.7), sie zeichnen sich ebenfalls durch eine VCA-Region aus, mit der sie Aktin und den Arp2/3-Komplex binden und aktivieren können (Machesky und Insall, 1998; Machesky et al., 1999; Suetsugu et al., 1999).

Über die ebenfalls vorhandene Prolinreiche Region interagieren die WAVE-Proteine vermutlich mit anderen SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen als WASP und N-WASP. Z.B. kann die Assoziation mit der Abelson-Tyrosinkinase (Abl) zu Tyrosin-Phosphorylierung bei WAVE2 und infolgedessen zu seiner Aktivierung führen (Leng et al., 2005; Westphal et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass WAVE1 mit WRP (‚WAVE-associated RacGAP protein‘), einem Rac-spezifischen GAP, interagiert (Soderling et al., 2002).

Die in WAVE-Proteinen ebenso existente basische Region (B) kann mit PIP_3 interagieren, was zur Rekrutierung von WAVE2 an die lamellipodiale Spitze beiträgt (Oikawa et al., 2004). Die N-terminale Region der WAVE-Proteine ist innerhalb der drei Isoformen stark konserviert, doch sehr unterschiedlich zum N-Terminus von WASP und N-WASP. Im Gegensatz zur WH1-Domäne von WASP/N-WASP weist die Sequenz der WHD (WAVE-Homologie-Domäne) keine Homologie zu EVH1-Domänen auf (Miki und Takenawa, 2003). Auch waren bis vor kurzem keine Bindungspartner für die WHD bekannt, doch inzwischen ist gezeigt worden, dass Abi1 (Abelson-interacting protein 1') mit dieser für WAVE spezifischen Domäne interagieren kann (Innocenti et al., 2004; Leng et al., 2005).

Ein weiterer signifikanter Unterschied zu WASP/N-WASP ist das Fehlen der GTPase-Binde-Domäne (GBD). Folglich können die WAVE-Proteine nicht direkt mit den kleinen Rho-GTPasen interagieren und liegen auch nicht in einer autoinhibierten Konformation vor (Machesky et al., 1999). Dennoch wurde schon zu einem frühen Zeitpunkt in der Charakterisierung der WAVE-Proteine gezeigt, dass sie ‚downstream‘ von der kleinen Rho-GTPase Rac agieren (Miki et al., 1998b). Im Einklang dazu stehen diverse Publikationen, die eine Lokalisation von WAVE an der lamellipodalen Spitze demonstrieren (Hahne et al., 2001; Nakagawa et al., 2001; Nozumi et al., 2003). Ferner bestätigen genetische ‚knockouts‘ von WAVE2 und WAVE1 die Wichtigkeit dieser Proteine für die Zellmigration und die Lamellipodienbildung (Yamazaki et al., 2005; Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003).

Der molekulare Aufbau der indirekten Interaktion von WAVE und der Rho-GTPase Rac wird in den beiden folgenden Kapiteln näher beschrieben.

1.5.3 Der WAVE-Komplex

Im Gegensatz zu N-WASP verfügen WAVE-Proteine über keine GTPase-Binde-Domäne in ihrem N-Terminus und interagieren daher nicht direkt mit Rho-GTPasen (s.o.). Nichtsdestotrotz agieren WAVE-Proteine ‚downstream‘ von Rac (Miki et al., 1998b). Für die Weiterleitung der Signale von Rac zu WAVE müssen folglich weitere Moleküle eine Rolle spielen.

Edel et al. (2002) isolierten WAVE1 aus Rinderhirn und zeigten, dass es sich in einem Komplex mit vier weiteren Proteinen befindet: Nap1 (Nck-associated protein 1'); PIR121/Sra-1 (Specifically Rac-associated'), Abi-2 (Abelson interactor 2') und HSPC300 (haemopoietic stem progenitor cell 300'). In diesem Komplex liegt WAVE1 in inaktiver, inhibierter Form vor, erst die Zugabe von aktivem Rac oder dem Adapterprotein Nck (non catalytic region of tyrosine kinase') führt zu einer Dissoziation des Komplexes und der

Aktivierung von WAVE1 (Eden et al., 2002). Neuere *in vitro*-Rekonstitutionsexperimente und *in vivo*-Studien stellen dieses Inhibierungsmodell jedoch in Frage. Diese Studien bestätigten zwar, dass der Grossteil von zellulärem WAVE komplexiert mit Nap1, Sra-1, Abi1 und HSPC300 vorliegt, doch sie zeigen im Gegensatz zum früheren Modell, dass der WAVE-Komplex nicht durch Zusatz von aktivem Rac dissoziiert (Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004). Außerdem wurde beobachtet, dass sämtliche WAVE-Komplex-Komponenten simultan nach Rac-Aktivierung an die lamellipodialen Spitze motiler Zellen translozieren (Steffen et al., 2004). Dies unterstützt die Annahme, dass der Komplex als Einheit vorliegt und rekrutiert wird. Abbildung 1.9 zeigt eine schematische Darstellung der Aktivierung des WAVE-Komplexes.

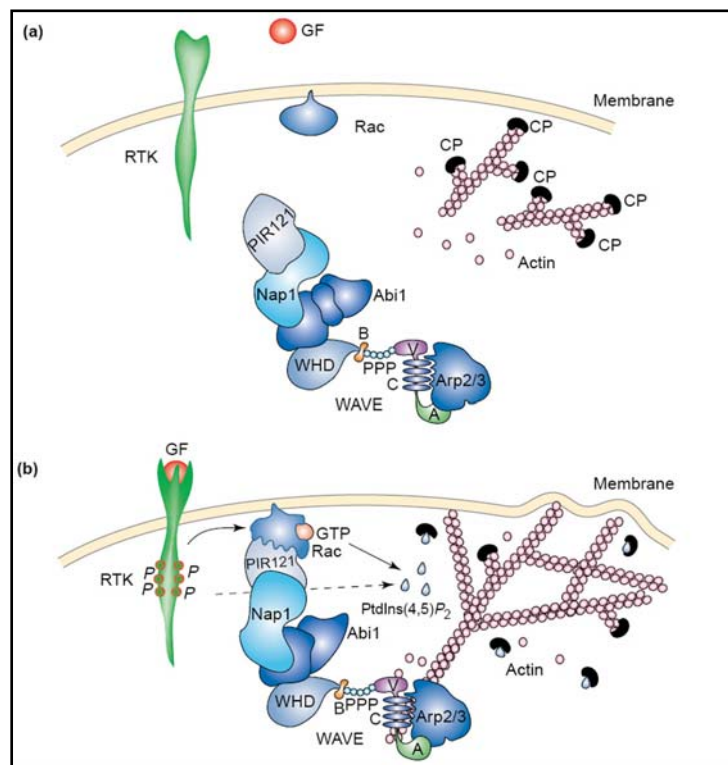


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Aktivierung des WAVE-Komplexes. In diesem Modell der Aktivierung von WAVE ist der PIR121(Sra-1)/Nap1/Abi1/WAVE-Komplex stabil und kann vermutlich den Arp2/3-Komplex im Zytosol unstimulierter, ruhender Zellen binden, wobei die Aktinpolymerisation aber noch verhindert ist. (a) Die (+)-Enden der Aktinfilamente sind durch Capping Proteine (CP) bedeckt, so dass die Aktinpolymerisation unterbunden ist. (b) Durch die Stimulation einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) mit Wachstumsfaktoren (WF) wird die kleine Rho-GTPase Rac aktiviert und das „uncapping“ der Aktinfilamente sowie die *de novo*-Aktinpolymerisation in Gang gesetzt. Dies wird durch die Produktion des Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphates (PIP₂) erreicht, welches die Aktivität der Capping Proteine negativ reguliert. Außerdem führt die Rac-abhängige Relokalisation des WAVE-Komplexes an die vordere Zellfront zu Generierung und effizientem Wachstum von Aktinfilamenten, die die Zellmotilität durch den Vorschub der Membran begünstigen (A, saure Region; B, basische Region; C, Cofilin-Homologie-Domäne; PPP, Prolinreiche Region; V, Verprolin-Homologie-Domäne; WHD, WAVE-Homologie-Domäne) (Stradal et al., 2004).

Des Weiteren führt die Entfernung jeder dieser WAVE-Komplex-Komponenten (außer WAVE) zur Degradation von WAVE (Blagg et al., 2003; Innocenti et al., 2004; Kunda et al.,

2003; Steffen et al., 2004). Der WAVE-Komplex kann als funktionelle Einheit betrachtet werden, denn werden Nap1, Sra-1 oder Abi1 mittels RNA-Interferenz aus dem System genommen, so ist die Wachstumsfaktor-induzierte, Rac-vermittelte Formation von Lamellipodien außer Kraft gesetzt (Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004).

1.6 IRSp53

Neben dem oben beschriebenen WAVE-Komplex-Modell existiert ein weiteres Konzept, das die indirekte Interaktion zwischen Rac und WAVE zu erklären versucht. Hierbei wird der Kontakt zwischen der Rho-GTPase und dem Arp2/3-Komplex-Aktivator über ein einzelnes Effektorprotein hergestellt: IRSp53 („Insulin receptor substrate p53”; 58 kDa).

IRSp53 wurde ursprünglich als ein Mitglied der Insulin Rezeptor Substrat-Proteinfamilie in Hamsterzellen entdeckt (Yeh et al., 1996). Diese Proteine werden durch Insulin oder Insulin-Wachstumsfaktor1(IGF1)-Rezeptoren phosphoryliert und aktivieren daraufhin eine Reihe von Signalwegen (Thomas et al., 2001). Das humane Homolog wurde als Bindungspartner des Serpentin-Rezeptors BAI1 („brain-specific angiogenesis inhibitor 1”) und des DRPLA („dentatorubral pallidoluyasian atrophy”) Proteins, das im Zusammenhang mit einer neurodegenerativen Krankheit steht, identifiziert (Oda et al., 1999; Okamura-Oho et al., 1999).

Es wurde gezeigt, dass IRSp53 über ein in seinem N-Terminus liegendes Rac-Bindungsmotiv (RCB) mit Rac interagiert, während es über die SH3-Domäne mit der Polyprolin-Region von WAVE2 in Kontakt tritt (Miki et al., 2000). Die spezifische Interaktion von IRSp53 mit Rac wurde aber in Frage gestellt, denn es wurde beobachtet, dass IRSp53 über sein partielles CRIB-Motiv in GTP-abhängiger Weise sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit Cdc42, aber nicht mit Rac interagiert und die ektopische Expression von IRSp53 zur Formation von Filopodien führt (Govind et al., 2001; Krugmann et al., 2001). Dabei zeigte sich, dass IRSp53 mit dem Ena/VASP-Protein Mena („mammalian enabled”) interagiert, welches ebenfalls ein wichtiger Regulator der Aktinreorganisation ist und im Zusammenspiel mit IRSp53 die Cdc42-vermittelte Formation von Filopodien induzieren kann (Krugmann et al., 2001). Des Weiteren stellte sich heraus, dass IRSp53 in einer autoinhibitierten Form vorliegt, bei der der N-Terminus an die zentrale Region des Proteins bindet und die erst durch Interaktion mit anderen Molekülen in eine offene, aktive Konformation übergeht (Krugmann et al., 2001; Miki und Takenawa, 2002).

Die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der Funktion und GTPasen-Spezifität von IRSp53 rühren unter Umständen von der Verwendung unterschiedlicher Splice-Varianten her. Bisher sind vier Varianten des humanen IRSp53 bekannt, die sich hauptsächlich in ihrem C-Terminus unterscheiden (Miyahara et al., 2003).

Die Rolle von IRSp53 als wichtiger Regulator der Aktinreorganisation wird durch weitere Beobachtungen gestützt. Zum einen zeigte sich, dass IRSp53 über seine SH3-Domäne an Eps8 binden kann (Funato et al., 2004). Eps8 („epidermal growth factor receptor pathway substrate 8“) ist eine Komponente eines Rac-spezifischen GEF-Komplexes mit Sos-1 („son of sevenless“) und Abi1 („Abelson interactor 1“), welcher für die Signalweiterleitung von der GTPase Ras und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) an Rac und somit die Formation von „membrane ruffles“ wichtig scheint (Scita et al., 1999; Scita et al., 2001). Ein weiteres Rac-GEF –Tiam1 („T-Cell lymphoma invasion and metastasis“)- zählt ebenfalls zu den Bindungspartnern von IRSp53 und unterstützt möglichenfalls so die Bildung eines Rac-IRSp53-WAVE-Komplexes, der wichtig für die durch den Wachstumsfaktor PDGF („Platelet derived growth factor“) induzierte, Rac-vermittelte Bildung von Lamellipodien ist (Connolly et al., 2005). Außerdem wurde eine Rho-abhängige Interaktion von IRSp53 mit dem Formin mDia1 beschrieben (Fujiwara et al., 2000). Die Relevanz dieser Interaktion bedarf aber weiterer Analysen.

Abbildung 1.10 zeigt den schematischen Aufbau von IRSp53 mit seinen charakteristischen Domänen und Bindemotiven.

Trotz detaillierter Analysen der Interaktionen sowie aufgrund kontroverser Diskussionen ist die genaue Rolle und Funktion von IRSp53 in der Regulation der Aktinreorganisation noch nicht eindeutig geklärt.

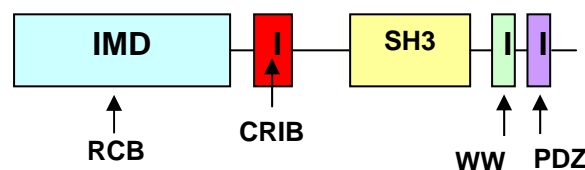


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von IRSp53. Die IRSp53/MIM-Homologie-Domäne (IMD) besitzt F-Aktin-Bündelungsaktivität und interagiert mit der Rho-GTPase Rac (RCB). Über die CRIB-Domäne erfolgt die Interaktion mit der kleinen Rho-GTPase Cdc42 (Cdc42/Rac interaktive binding). Über die SH3-(Src-Homologie)-Domäne wird die Bindung an Aktin-Regulatoren mit Prolinreichen Regionen wie z.B. WAVE2 vermittelt. Außerdem besitzt IRSp53 selbst ein kurzes SH3-Bindemotiv (Poly-Proline) zwischen der CRIB- und SH3-Domäne (nicht angezeigt). Das WW-Bindemotiv vermittelt die Bindung an Proteine mit zwei konservierten Tryptophan-Resten. Über das PDZ-Bindemotiv (PSD-95/Disc large/ZO-1) erfolgt die Interaktion mit Gerüst-Proteinen der Post-Synapse.

Aufgrund von Datenbankrecherchen mit der Aminosäuresequenz von IRSp53 wurden zwei weitere, verwandte Proteine entdeckt: IRTKS („Insulin receptor tyrosine kinase substrate“)

und FLJ22582. Sie verfügen ebenfalls über eine SH3-Domäne im C-Terminus, jedoch fehlt beiden Proteinen das CRIB-Motiv, und FLJ22582 enthält kein WW-Domäne (s. Abb. 1.11). Des Weiteren ist der N-Terminus (Aminosäure 1-250) dieser drei Proteine stark homolog und wird als IMD (‘IRSp53/Missing in metastasis-Domäne’) bezeichnet. Die IMD von IRSp53 induziert die Formation von Filopodien *in vivo* und die Entstehung von eng gebündelten Aktinfilamenten *in vitro*. Mit Hilfe einer speziellen Software (Kelley et al., 2000), die Proteinsequenzen mit bereits aufgelösten Strukturen homologer Proteine vergleicht, wurde für die IMD aller drei Proteine eine helikale Sekundärstruktur vorhergesagt (Yamagishi et al., 2004).

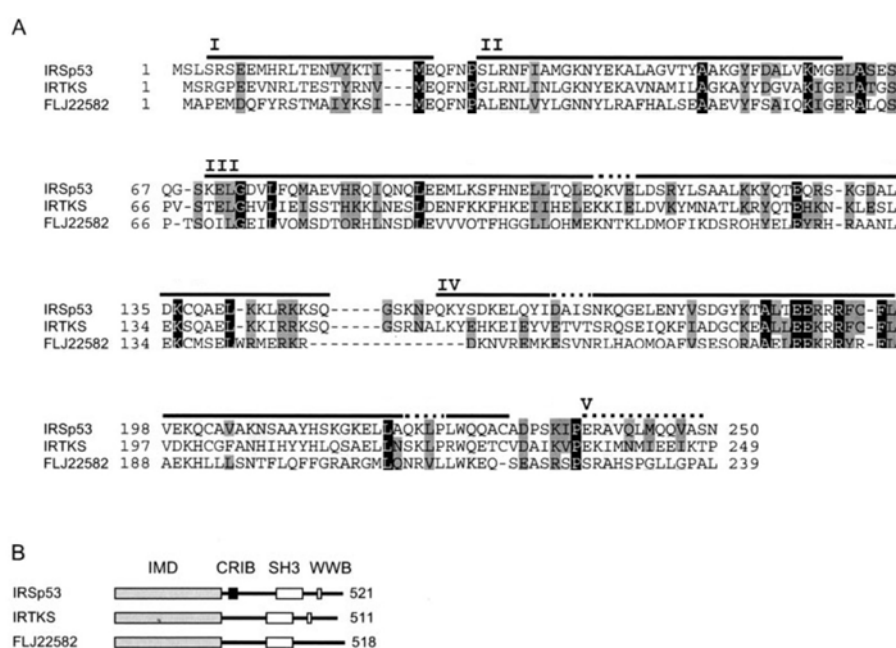


Abbildung 1.11: Die N-terminalen Domänen von IRSp53-Familienmitgliedern sind konserviert. (A) Aminosäuren-Sequenz-Vergleich des N-Terminus von humanen Proteinen mit IMD (IRSp53/Missing in metastasis-Domäne). Die Bereiche mit identischen Aminosäuren sind schwarz hinterlegt; hoch-konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau gefärbt, schwach konservierte Reste sind in hellgrau dargestellt. Die mit I-V bezeichneten Linien zeigen die laut Sequenzanalyse vorhergesagten helikalen Bereiche der Proteine. (B) Schematische Darstellung der Domänen-Zusammensetzung von humanen IMD-Proteinen. IRSp53 enthält ein partielles CRIB-Motiv, eine SH3-Domäne und ein WW-Bindemotiv. IRTKS fehlt das CRIB-Motiv, FLJ22582 das CRIB-Motiv sowie das WW-Bindemotiv (nach Yamagishi et al., 2004).

Die Funktion von IRTKS und FLJ22582 ist bis dato ungeklärt.

1.7 Die Rolle des zellulären Aktinzytoskeletts bei der Invasion von bakteriellen Pathogenen

Die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist für verschiedenste zelluläre Prozesse wie z.B. die Chemotaxis und Migration aber auch die Phagozytose und den intrazellulären Vesikeltransport von großer Bedeutung. Eine weitere, äußerst wichtige Rolle spielt die dynamische Aktinreorganisation in der Interaktion von mikrobiellen Pathogenen mit ihren Wirtszellen. Zahlreiche bakterielle Pathogene interferieren mit zellulären Signalwegen, um Aktinpolymerisationsprozesse für ihre Adhäsion an und die Invasion in die Zellen sowie ihre intra- und interzelluläre Ausbreitung zu induzieren.

Ein allgemeiner Mechanismus, der die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts stimuliert, ist die Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac. Einige Pathogene wie z.B. *Salmonella* und *Shigella* injizieren verschiedene Effektorproteine unmittelbar in das Zytoplasma der Wirtszelle, welche dann entweder Regulatoren der Aktinpolymerisation aktivieren (z.B. die Rho-GTPasen) oder die Polymerisation direkt beeinflussen. Andere Pathogene wie z.B. *Listeria monocytogenes* können ihre Aufnahme in nicht-phagozytotische Zellen durch die Stimulation einer Kombination von Signalwegen vermitteln, die normalerweise in der Zelladhäsion, der Migration oder der Wachstumsfaktor-induzierten Formation von Lamellipodien eine Rolle spielen. Diese Pathogene nutzen hierfür zelluläre Rezeptoren, um die für sie optimale Reaktion der Wirtszelle zu induzieren.

1.7.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein ubiquitäres, gram-positives, asporogenes Stäbchenbakterium mit sowohl tier- als auch humanpathogenen Eigenschaften. Es gehört zu der Gruppe der fakultativ intrazellulären Erreger und verursacht schwere lokale und systemische Infektionen, die als Listeriose bezeichnet werden. Die humane Listeriose wird hauptsächlich durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel ausgelöst und verläuft bei immunkompetenten Menschen meist unbemerkt. Bei immunsupprimierten Personen hingegen kann es zu schweren Krankheitsverläufen kommen. Denn eine wesentliche Pathogenitätseigenschaft des Erregers besteht in der Fähigkeit, aktiv in Epithel- und Endothelzellen einzudringen, so dass wichtige Schutzbarrieren des Körpers (Darmepithel-, Bluthirn- und Plazentaschranke) überwunden werden können. In Folge dessen kann es zu gefährlichen Krankheitsbildern wie Gastroenteritis, Sepsis und Meningitis kommen, wobei die Gesamtmortalitätsrate bei 20-30% liegt (Roberts und Wiedmann, 2003; Vazquez-Boland et al., 2001b).

Listeria monocytogenes vermittelt seine Aufnahme in normalerweise nicht-phagozytotische Wirtszellen durch zwei separate, aber kooperierende Mechanismen, die von Proteinen der Internalin-Familie eingeleitet werden (s. Abb. 1.12). Internaline verfügen über charakteristische Wiederholungen von Leucinreichen Sequenzen im N-Terminus (LRR, ‚leucine rich repeats‘), die an spezifischen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Vazquez-Boland et al., 2001a).

Internalin (InlA) ist ein Oberflächenmolekül, welches über seine C-terminale Domäne kovalent mit der bakteriellen Zellwand verbunden ist. Seine LRR- ist im Zusammenspiel mit einer Inter-Repeat-Domäne (IR) ausreichend für die Vermittlung der listeriellen Invasion (Lecuit et al., 1997). InlA interagiert mit humanem E-Cadherin, einem Transmembran-Glycoprotein, das auf Epithelzellen exprimiert wird und üblicherweise durch homophile Interaktionen mit benachbarten Zellen die Zell-Zell-Adhäsion vermittelt (Mengaud et al., 1996). Der Signalkomplex, der durch die Interaktion von InlA mit E-Cadherin rekrutiert wird, ist über α - und β -Catenine mit dem Aktinzytoskelett der Wirtszelle verbunden (Lecuit et al., 2000). Außerdem ist das Motorprotein Myosin VIIA in den InlA-vermittelten Signalweg involviert. Es wird über seinen Liganden –das Transmembran-Molekül Vezatin- an die Zellmembran rekrutiert, wo es durch die Verkopplung mit der Aktinpolymerisation vermutlich die notwendige Kraft für die Internalisierung von *Listeria* erzeugt (Sousa et al., 2004). Ferner wird die E-Cadherin-Bindung mit einer Aktivierung der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3-K) und der Lokalisation des Arp2/3-Komplexes an der Aufnahmestelle in Verbindung gebracht (Kovacs et al., 2002a; Kovacs et al., 2002b). Diese Vorgänge tragen höchstwahrscheinlich entscheidend zu der die listerielle Aufnahme begleitenden Aktinreorganisation bei.

Internalin B (InlB) ist im Gegensatz zu InlA nicht kovalent mit der bakteriellen Zellwand verbunden, sondern nur lose über so genannte GW-Module an ihr angeheftet (Jonquieres et al., 1999). Außerdem kann es im Kontrast zu InlA die Aufnahme von *Listeria* in eine Vielzahl von Zellen - einschließlich Hepatozyten und nicht-epitheliale Zellen - vermitteln (Dramsi et al., 1995). InlB wurde als Ligand des Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptors c-Met identifiziert. Die Interaktion erfolgt über die N-terminale Leucinreiche Region, während der C-Terminus von InlB Glucosaminoglycane (GAGs) binden kann (Jonquieres et al., 2001; Shen et al., 2000). Die Interaktion von InlB mit c-Met und dessen Ko-Rezeptor CD44 führt möglicherweise zur Aktivierung der PI3-Kinase und der Rho-GTPase Rac. Daraufhin werden vermutlich diverse ‚downstream‘-Effektorproteine involviert, die schlussendlich eine dem Wachstumsfaktor-induzierten ‚membrane ruffling‘ ähnliche Aktinreorganisation einleiten

(Cossart et al., 2003; Cossart und Sansonetti, 2004). Die Invasion von *Listeria* geht aber ungeachtet dessen ohne massive Veränderungen der Zell-Oberfläche einher und wird als Zipper-Mechanismus bezeichnet (Isberg und Van Nhieu, 1994).

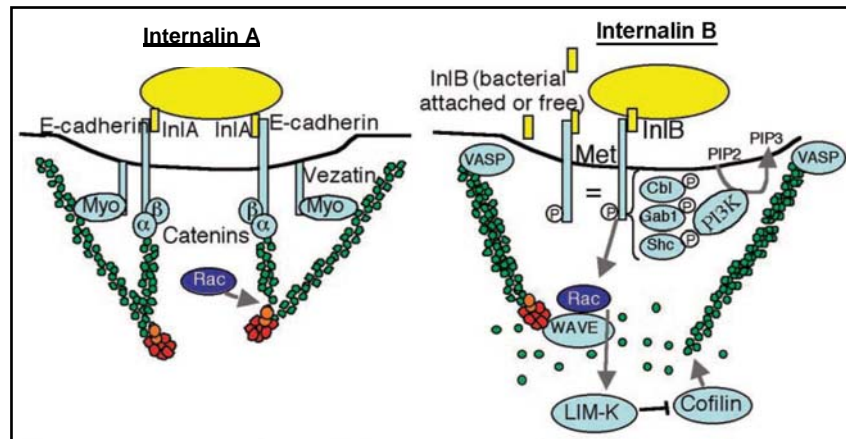


Abbildung 1.12: *Listeria monocytogenes* vermittelt seine Invasion über den Zipper-Mechanismus. *Listeria monocytogenes* kann seine Invasion in nicht-phagozytische Zellen durch zwei separate, aber kooperierende Mechanismen vermitteln. Das bakterielle Oberflächenprotein Internalin (InlA) bindet an den Zell-Rezeptor E-Cadherin und induziert so die Akkumulation von Proteinen, die üblicherweise bei der Bildung von zellulären Adhäsionskontakten involviert sind. Internalin B (InlB) interagiert mit der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met sowie Glucosaminoglykanen und induziert so eine Signalkaskade, die die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) auslöst und zur Aktivierung der Rho-GTPase Rac führt. Aufgrund dessen kommt es schließlich zu Aktinreorganisation an der Aufnahmestelle des Bakteriums (gelb: *Listeria* / Internaline, grün: Aktin, rot: Arp2/3-Komplex) (aus Cossart und Sansonetti, 2004).

1.7.2 *Shigella flexneri*

Das gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterium *Shigella flexneri* gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae und ist der Erreger der bakteriellen Ruhr (auch Shigellose genannt). Das Pathogen ist hoch infektiös, schon eine Dosis von 100 Bakterien ist für die Infektion eines erwachsenen Menschen ausreichend (DuPont et al., 1989). Die Infektion erfolgt im Allgemeinen über den oralen Weg durch mit Fäkalien kontaminiertes Wasser (Jennison und Verma, 2004). Im Dickdarm angekommen, dringt *Shigella* in die Schleimhaut ein. Nach Penetration der Darm-Epithelzellen repliziert und verbreitet sich das Bakterium innerhalb der Zellen. Im Kontext mit der Entzündungsreaktion des Wirtes wird das Darm-Epithelgewebe zerstört, und es kommt zu den Shigellose-typischen Symptomen wie z.B. blutige Diarrhoe (Philpott et al., 2000).

Shigella flexneri vermittelt seine Invasion in die Wirtszelle über einen makropinozytischen Prozess, bei dem durch das Bakterium induzierte Veränderungen des Aktinzytoskeletts die Shigelle in einer Vakuole einhüllen (Jennison und Verma, 2004). Für die Invasion wird ein Typ III Sekretionssystem (T3SS) benötigt, über das bakterielle Effektorproteine in das

Zytoplasma der Wirtszelle transloziert werden (Tran Van Nhieu et al., 2000). Die bedeutendsten Virulenzfaktoren sind die Invasionsplasmid-Antigene IpaA, IpaB, IpaC, IpaD sowie virA, IpgD und IpgB1 (s. Abb. 1.13). Die molekularen Mechanismen, über die diese Effektorproteine die Invasion von *Shigella* auslösen, sind aber noch kaum verstanden (Nhieu et al., 2005).

Die Sekretion wird durch den Kontakt des Bakteriums mit der Zelle aktiviert. Zunächst binden IpaC und IpaB aneinander (Harrington et al., 2003). Aufgrund ihrer Hydrophobizität fügen sie sich in die Wirtszellmembran ein und bilden eine Pore, über die weitere Virulenzfaktoren Zugang zu der Zelle finden (Blocker et al., 1999). Während der N-terminale Teil von IpaC mit IpaB interagiert, beeinflusst der C-terminale Abschnitt die Aktinreorganisation. Zum einen wird der C-Terminus von IpaC mit der Aktivierung von Rac und Cdc42 in Verbindung gebracht. Da aber *in vitro* keine GEF-Aktivität für IpaC nachgewiesen werden konnte, erfolgt die Aktivierung der Rho-GTPasen wahrscheinlich indirekt (Tran Van Nhieu et al., 1999). Zum anderen wurde unlängst gezeigt, dass die C-terminale Domäne von IpaC die Aktinpolymerisation direkt stimulieren kann (Kuelto et al., 2003). Neben IpaC wird ein weiterer Effektor mit Rac-Aktivierung in Zusammenhang gebracht: VirA. Es induziert die Depolymerisation von Mikrotubuli (Yoshida et al., 2002). Die Repolymerisation der Mikrotubuli an der Zellmembran geht vermutlich mit Rac-vermitteltem ‚membrane ruffling‘ einher (Yoshida und Sasakawa, 2003). Des Weiteren unterstützt ein neuer Effektor –IpgB1– die Invasion von *Shigella* (Ohya et al., 2005), indem es mittels molekularer Mimikry die aktivierte Rho-GTPase Rac nachahmt (Alto et al., 2006).

Eine Involvierung von Tyrosinkinase-Signalwegen bei der Vermittlung einer effizienten Invasion wird außerdem in Betracht gezogen. Sie agieren womöglich ‚upstream‘ oder parallel von den Rho-GTPasen (Nhieu et al., 2005). Tyrosinkinasen der Abelson-Familie (Abl/Arg) vermitteln die Phosphorylierung des Adapterproteins CrkII und die darauffolgende Aktivierung von Rac und Cdc42. Werden diese Kinasen auf genetischer Ebene entfernt, so führt dies zu einer beeinträchtigten Invasionseffizienz von *Shigella* in den entsprechenden Zellen (Burton et al., 2003). Crk (‚CT10 regulator of kinase‘) wiederum interagiert über seine SH2-Domäne mit Tyrosin-phosphoryliertem Cortactin, einem Src-Kinasen-Substrat und Aktin-Regulator, der sowohl mit F-Aktin als auch dem Arp2/3-Komplex interagieren kann (s.o.) und so ebenfalls in den Invasionsprozess von *Shigella* involviert ist (Bougneres et al., 2004; Dumenil et al., 2000; Selbach und Backert, 2005).

Ein weiteres bakterielles Effektorprotein, das direkt mit einem zytoskeletalen Protein der Wirtszelle interagiert, ist IpaA. Es bindet Vinculin, welches in die Bildung von fokalen

Adhäsionen involviert ist und zumindest *in vitro* im Zusammenspiel mit IpaA eine Aktindepolymerisationsaktivität zeigt (Bourdet-Sicard et al., 1999). Es wird angenommen, dass die IpaA-vermittelte Depolymerisation die lokale Einstülpung der Plasmamembran unterhalb des Bakteriums während späterer Stadien der Invasion unterstützt (Tran Van Nhieu et al., 2000).

Überdies interferiert der Virulenzfaktor IpgD mit der Aktinfilamentdynamik. IpgD ist eine Inositol 4-Phosphatase und dephosphoryliert PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) zu PIP (Phosphatidylinositol 5-monophosphat), was vermutlich die Verbindung von Aktinfilamenten mit der Plasmamembran lockert und so die Insertion von Aktin-Monomeren in an die Membran angrenzende Filamente erleichtert (Niebuhr et al., 2002).

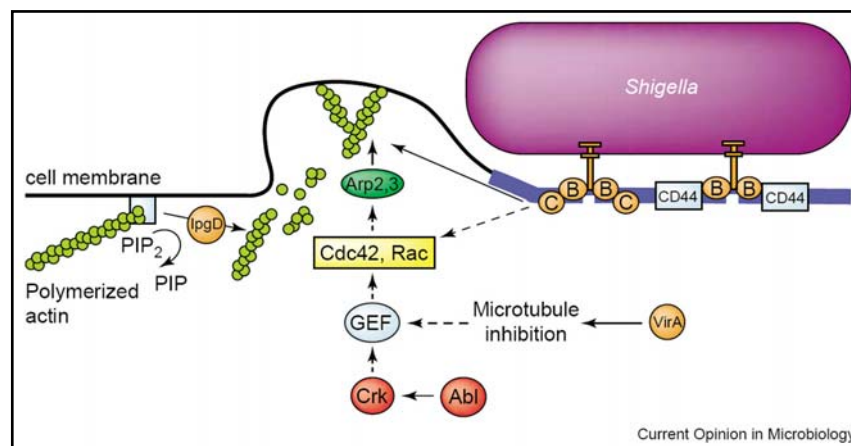


Abbildung 1.13: *Shigella flexneri* vermittelt seine Invasion über den Trigger-Mechanismus. *Shigella flexneri* induziert seine Aufnahme in die Wirtszelle über die Abgabe von Virulenzfaktoren in das Wirtszytoplasma mittels eines Typ III Sekretionssystems. Durch Bindung von IpaB (B) an CD44 wird das Typ III Sekretionssystem vermutlich an Cholesterol-reiche Mikrodomänen (blau) der Zellmembran rekrutiert. IpaC (C) löst die Aktinpolymerisation direkt oder in einer Rho-GTPase-abhängigen Weise aus. VirA und die Abl/Arg-Kinasen vermitteln höchstwahrscheinlich die Aktivierung von GEFs für Cdc42 und Rac. IpgD hydrolysiert PIP₂ und unterstützt die *de novo* Aktinpolymerisation durch Ablösen des kortikalen Aktins von der Membran (aus Nhieu et al., 2005).

1.7.3 *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium ist ein gram-negatives, enteropathogenes Stäbchenbakterium, das in Menschen und anderen warmblütigen Säugern leichte Infektionen wie Gastroenteritis bis hin zu schwerem, systemischen, typhoiden Fieber auslösen kann. Ein wichtiger Schritt in der Pathogenität von *Salmonella* ist seine Fähigkeit, in nicht-phagozytische Zellen einzudringen, denn die intrazelluläre Umgebung bietet eine sichere Nische für die Vermehrung des Bakteriums unter Umgehung der Wirtszell-Immunantwort (Zhou und Galan, 2001). Mit der Nahrung aufgenommene Bakterien interagieren mit der Oberfläche von

Epithelzellen des Dünndarms über ein Typ III Sekretionssystem (T3SS), durch das sie Effektorproteine in die Wirtszelle einbringen. Diese Proteine veranlassen die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, was schlussendlich zu der Aufnahme des Pathogens führt (Rottner et al., 2005). Hierbei ist zu bemerken, dass einige Proteine, die Teil des T3SS sind und in direktem Kontakt mit der Wirtszelle stehen, selber als translozierte Effektorproteine fungieren können (Coombes und Finlay, 2005).

Von sechs bakteriellen Effektorproteinen wurde bisher gezeigt, dass sie direkt oder indirekt mit Aktin oder Regulatoren der Aktinpolymerisation interagieren können (s. Abb. 1.14). Die *Salmonella* Outer Proteine (Sop) E, E2 und B induzieren die Reorganisation des Aktinzytoskeletts über die Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac. SopE und SopE2 agieren hierbei *in vitro* als GEFs für die GTPasen, wobei SopE ein GEF für sowohl Rac als auch Cdc42 ist, während die Spezifität von SopE2 auf Cdc42 beschränkt zu sein scheint (Friebe et al., 2001; Hardt et al., 1998). SopB (auch SigD genannt) ist eine Inositol-Polyphosphatase, die die Invasion vermutlich durch die indirekte Aktivierung von Cdc42 und die rapide Bildung von *Salmonella*-enthaltenden Phagosomen beeinflusst (Terebiznik et al., 2002; Zhou et al., 2001). Im Gegensatz zu der Aktivierung der Rho-GTPasen verfügt *Salmonella* aber auch über Effektoren, die die Aktivität der GTPasen herunterregulieren. SptP (*Salmonella typhimurium* protein tyrosine phosphatase') weist GAP-Aktivität gegenüber Cdc42 und Rac auf und dämpft die Aktinreorganisation nach erfolgter Invasion des Pathogens ein (Fu und Galan, 1999; Kubori und Galan, 2003).

Zwei weitere *Salmonella*-Invasionsproteine (Sip) interagieren direkt mit Aktin: SipA und SipC. SipA reguliert die Aktindynamik über zwei Mechanismen. Zum einen bindet und stabilisiert es Aktinfilamente (Higashide et al., 2002; Jepson et al., 2001; Zhou et al., 1999). Zum anderen kann es den Aktivitäten von ADF/Cofilin und Gelsolin entgegenwirken, wobei es mit ADF/Cofilin um die Interaktion an F-Aktin konkurriert oder die durch Gelsolin zertrennten Aktinfilamente wieder reassoziieren lässt (McGhie et al., 2004). SipC kann über seinen C-Terminus Aktin direkt polymerisieren und über seinen N-Terminus Aktinfilamente zu Bündeln verbinden (Hayward und Koronakis, 1999). SipA vermag bei diesen Prozessen mit SipC zu kooperieren (McGhie et al., 2001).

Die molekularen Mechanismen, die *downstream* der *Salmonella*-vermittelten Rho-GTPasen-Aktivierung die Reorganisation des Aktinzytoskeletts induzieren sind noch unklar. Möglicherweise wird dieser Prozess durch Proteine der WASP/WAVE-Familie vermittelt (Rottner et al., 2005; Unsworth et al., 2004).

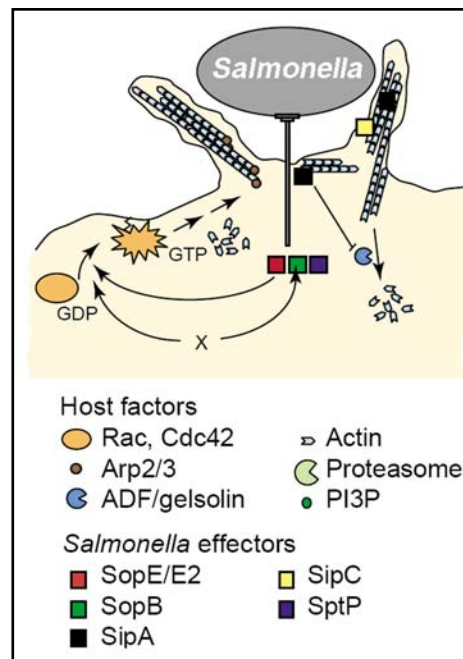


Abbildung 1.14: *Salmonella typhimurium* vermittelt seine Invasion über den Trigger-Mechanismus. *Salmonella typhimurium* transloziert mehrere Effektoren in die Wirtszelle. Die GEFs SopE/E2 und die Inositol-Phosphatase SopB induzieren die Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac, was Aktinpolymerisation zur Folge hat, die vermutlich über den Arp2/3-Komplex vermittelt wird. SipA begünstigt die Polymerisation von F-Aktin und kann die Filamente bündeln. Außerdem verhindert es die Depolymerisation des F-Aktins, indem es die wirtseigenen Proteine ADF/Cofilin und Gelsolin inhibiert. SipC kooperiert bei diesen Prozessen mit SipA. SptP agiert als GAP, welches den Aktivierungsstatus der Rho-GTPasen nach der Invasion in den Normalzustand zurück überführt (Patel und Galan, 2005).

1.8 Ziel dieser Dissertation

In vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe wurden diverse Signalwege zur Aktinreorganisation anhand von Zelllinien untersucht, die nach genetischer Deletion oder RNA Interferenz Defekte in ausgewählten Aspekten der Aktinreorganisation aufwiesen. Dabei konnte z.B. gezeigt werden, dass der ubiquitäre WAVE-Komplex essentiell für Rac-vermittelte Lamellipodien- und ‚Ruffle‘-Bildung ist (Steffen et al., 2004), aber weder N-WASP für Cdc42-induzierte Filopodienbildung benötigt wird (Lommel et al., 2001), noch Cdc42 selbst für Filopodienformation über andere Signalwege wichtig ist (Czuchra et al., 2005). Die Aufnahme vieler invasiver Pathogene in Wirtszellen geht mit einer signifikanten Umordnung des Aktinzytoskeletts einher. Die gängige Meinung ist, dass diese Reorganisation von den Pathogenen induziert wird, indem über ihre Virulenzfaktoren jene zellulären Signalübertragungswege angesprochen werden, die auch in nicht infizierten Zellen zu der Ausbildung vergleichbarer Strukturen beitragen.

Um diese Hypothese experimentell zu untersuchen wurde die Invasion der bakteriellen Pathogene *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* und *Salmonella typhimurium* –mit besonderem Fokus auf das Letztere- in verschiedene Zelllinien mit Defekten in der Aktinreorganisation untersucht.

Ziel dieser Doktorarbeit war es somit, die für die Invasion relevanten Signalwege auf der Wirtszellseite zu untersuchen. Des Weiteren wurden im Falle von *Salmonella typhimurium* die morphologischen Veränderungen der verschiedenen Zelllinien während der Invasion sowie die Effekte ausgewählter Virulenzfaktoren genauer untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biontex, Biorad, Boehringer Mannheim, Fermentas, Fluka, Höchst, LifeTechnologies, Merck, Millipore, Minerva Biolabs, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Riedel de Haen, Roche, Roth und Serva bezogen. Alle Substanzen haben den Reinheitsgrad „p.a.“ bzw. „reinst“. Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem MilliQ-System von Millipore aufbereitet wurde.

2.1.2 Zellkulturreagenzien und Plastikware

Zellkulturmedien und Zusätze wurden von den Firmen Gibco, Invitrogen, PAA und Sigma bezogen. Die verwendete Plastikware stammte von Corning, Falcon, Greiner und Nunc.

2.1.3 Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie

Die verwendeten Enzyme stammten von New England Biolabs, MBI Fermentas oder Roche. Die Pfu-DNA-Polymerase wurde von Stratagene bezogen, die Pwo-DNA-Polymerase, die T4-DNA-Ligase sowie die Alkalische Phosphatase von Roche, während die Taq-Polymerase von TaKaRa stammte. Die dNTPs kamen von TaKaRa bzw. MBI Fermentas.

Der verwendete DNA-Standard wurde von Eurogentec bezogen, die Protein-Marker von MBI Fermentas sowie Bio-Rad.

2.2 Bakterienkultur

2.2.1 Bakterienstämme

- *Escherichia coli*: TG2 (Stratagene)
TOP10F' (Invitrogen)
- *Listeria monocytogenes*: - EGD, Serotyp 1/2a
- Δ inlA/B

- *Shigella flexneri*: - M90T, Serotyp 5
 - Δ mxID (Guy Tran Van Nhieu, Paris)
- *Salmonella typhimurium* : - SL1344 Wildtyp
 - Δ sipB (Dirk Bumann, Hannover)
 - Δ sopE/E2 (Dirk Bumann, Hannover)
 - Δ sopB/E/E2 (Dirk Bumann, Hannover)

2.2.2 Bakterienkulturmedien und Zusätze

- | | | |
|---|--------------------------|----------|
| • LB-Medium (“Luria Bertani broth”): | Bacto-Trypton | 10 g/l |
| | Bacto-Hefeextrakt | 5 g/l |
| | NaCl | 10 g/l |
| • BHI-Medium (“Brain-Heart Infusion”): | Brain-Heart Infusion | 37 g/l |
| • TSB-Medium (“Trypticase Soy Broth”) : | Trypticase-Soja-Bouillon | 30 g/l |
| • SOB-Medium: | Bacto-Trypton | 20 g/l |
| | Hefe-Extrakt | 5 g/l |
| | NaCl | 0,6 g/l |
| | KCl | 0,19 g/l |
| • SOC-Medium: | SOB-Medium | |
| | MgCl ₂ | 10 mM |
| | MgSO ₄ | 10 mM |
| | Glucose | 2 mM |

Die Glucose sowie die Magnesiumsalze wurden sterilfiltriert und vor Gebrauch aus einer Stammlösung hinzugesetzt.

- | | | |
|----------------|------------|--------|
| • Agarplatten: | Bacto-Agar | 15 g/l |
|----------------|------------|--------|

Nach Abkühlen des autoklavierten Agarmediums auf ca. 40°C wurden je nach Bedarf Antibiotika zugesetzt (Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol, Streptomycin) und das Medium auf Petrischalen ausgegossen.

2.2.3 Bakterienkulturbedingungen

<i>Escherichia coli</i> :	LB-Medium
<i>Listeria monocytogenes</i> :	BHI-Medium
<i>Shigella flexneri</i> :	TSB-Medium

Salmonella typhimurium: LB-Medium

Geräte: Schüttelinkubator (Multitron; Infors)

Umluft-Trockenschrank (Heraeus B606; Memmert BE50)

Die Flüssigkultur von Bakterien erfolgte in dem entsprechenden Medium bei 37°C und 180 rpm für 16-18 h.

Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerolkulturen angefertigt: 2 ml Medium wurden angeimpft und für 6-8 h bei 37°C inkubiert. 0,75 ml dieser sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Kultur wurden dann mit 0,25 ml 87% sterilem Glycerin gemischt und bei -70°C gelagert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Medien und Lösungen

Alle Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden sterilfiltriert (Steritop, Millipore).

- Wachstumsmedium 1:

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium; Gibco)	4,5	g/l Glucose
FCS PAA Clone (PAA)	10	%
L-Glutamin (Gibco)	2	mM
- Wachstumsmedium 2:

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium; Gibco)	4,5	g/l Glucose
FCS 34K3396 (SIGMA)	10	%
L-Glutamin (Gibco)	2	mM
Nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco)	1	x
Natrium-Pyruvat (Gibco)	1	mM
- Wachstumsmedium 3:

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium; Gibco)	1	g/l Glucose
FCS PAA Clone (PAA)	10	%
L-Glutamin (Gibco)	2	mM
- Observationsmedium:

Ham's F12 (25 mM HEPES und NaHCO_3 ; Sigma)		
FCS PAA Clone (PAA)	10	%
L-Glutamin (Gibco)	2	mM

- PBS (Phosphate-Buffered-Saline):

NaCl	137	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	10	mM
KH ₂ PO ₄	2	mM

- Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S; Gibco):

Penicillin	5000	U/ml
Streptomycin	5000	U/ml

Die P/S-Lösung wurde den Medien als Kontaminationsschutz zugesetzt (1:100).

2.3.2 Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft	Wachstums- medium
B16-F1	Maus-Melanom	ATCC (CRL-6323)	1
VA-13	Humane Lungen-Fibroblasten	ATCC (CCL 75.1)	1
NIH 3T3	Mausembryo-Fibroblasten	ATCC (CRL-1658)	2
Klon1	N-WASP ^{Flox/Flox} Maus-Fibroblasten	Lommel et al., 2001	3
1H51	N-WASP ^{Del/Del} Maus-Fibroblasten	Lommel et al., 2001	3
VA-13-pSR	Humane Lungen-Fibroblasten (Mock RNAi mittels pSUPER.retro.puro)	Doktorarbeit Anika Steffen / diese Arbeit	1 + 1 µg/ml Puromycin
NS14-4	Humane Lungen-Fibroblasten (Nap1 RNAi mittels pSUPER.retro.puro)	Doktorarbeit Anika Steffen (Steffen et al., 2004)	1 + 1 µg/ml Puromycin
3-9	Cdc42 ^{Flox/Del} Fibroblastoide Mauszellen	Cord Brakebusch, MPI Martinsried	2
3-9-7	Cdc42 ^{Del/Del} Fibroblastoide Mauszellen	Cord Brakebusch, MPI Martinsried	2

Tabelle 2.1 : Verwendete Zelllinien

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmide

pCR[®]4Blunt-TOPO / pCR[®]-Blunt II-TOPO (Invitrogen)

Die pCR-Plasmide wurden bei der direkten Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Das PCR-Produkt kann dabei ohne Modifikation in den Vektor eingefügt und mit universellen Primern sequenziert werden.

pEGFP-C1/-C2/-C3/-N1/-N2/-N3 (Clontech)

Die Fusion von Proteinen mit Fluorophoren wie EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) ist eine geeignete Methode, um die Verteilung dieser Proteine innerhalb von lebenden Zellen und Geweben zu beobachten. Mit Hilfe der pEGFP-Expressions-vektoren kann das Gen von Interesse oder Teilstücke davon als Fusion mit EGFP kloniert werden. Das durch Mutation veränderte Markenprodukt EGFP basiert auf einem ursprünglich aus der Qualle isolierten Protein, welches bei Anregung mit bläulichem Licht grün fluoresziert.

Die zu untersuchende Sequenz kann sowohl N- als auch C-terminal an das EGFP fusioniert werden (s. Abb. 2.1).

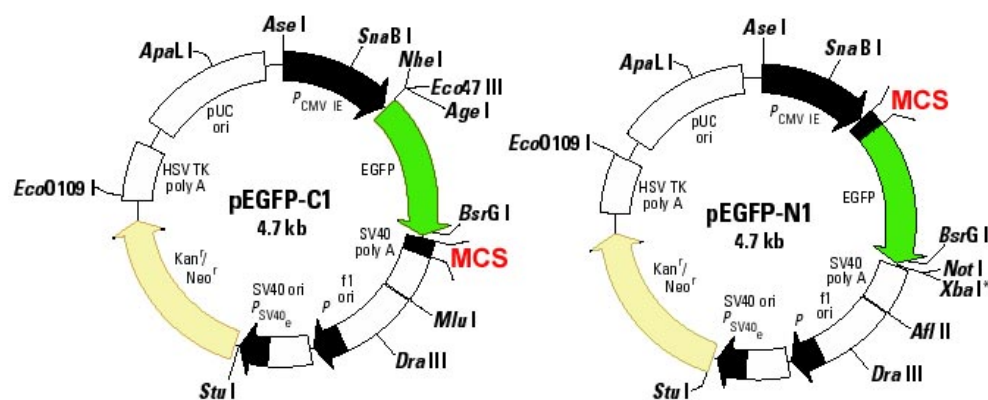


Abbildung 2.1: Plasmid-Karten der pEGFP-C1 und -N1 Fusionsvektoren.

Dargestellt sind die wichtigsten Abschnitte: Multiple Cloning site (MCS; rot), Antibiotikaresistenz (gelb), EGFP (grün), Promotor (P) und Transkriptions-/Replikationsstartstellen (Ori). Die MCS befindet sich bei pEGFP-C1 C-terminal, bei pEGFP-N1 N-terminal vom EGFP (nach Living Colors™ GFP Application Notes; Clontech Laboratories Ltd.).

pmRFP

Das in dieser Arbeit hergestellte pmRFP-Plasmid besteht aus dem pEGFP-C3- Vektor, dessen EGFP durch mRFP (**m**onomeric **R**ed **F**luorescent **P**rotein; z.V.g von Roger Y. Tsien; USA) ersetzt wurde.

pCMV-Sport6 / pOTB7

Die von der RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) bezogenen EST-Klone befanden sich in diesen Klonierungsvektoren, wobei pCMV-Sport6 zur Expression in eukaryotischen Systemen verwendet werden kann.

Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Konstrukt	Spezies	Herkunft
GFP-WAVE1 / WAVE1-GFP	Maus	Diese Arbeit
GFP-WAVE2 / WAVE2-GFP	Maus	Diese Arbeit
pmRFP-WAVE2	Maus	Diese Arbeit
GFP-WAVE3 / WAVE3-GFP	Maus	Diese Arbeit
GFP-Sra-1	Maus	Anika Steffen, GBF
GFP-IRSp53	Mensch	Tadaomi Takenawa, Japan (Nakagawa et al., 2003)
GFP-IRTKS / IRTKS-GFP	Maus	Diese Arbeit
GFP-FLJ22582 / FLJ22582-GFP	Mensch	Diese Arbeit
pRK5-myc-L61-Rac	Mensch	Laura Machesky, UK
pRK5-myc-L61-Cdc42	Mensch	Laura Machesky, UK
M45-sopE	<i>Salmonella typhimurium</i>	Wolf-Dietrich Hardt, Zürich (Stender et al., 2000)
M45-sopE2	<i>Salmonella typhimurium</i>	Wolf-Dietrich Hardt, Zürich (Stender et al., 2000)

Tabelle 2.2: Hergestellte und verwendete Konstrukte.

2.4.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech bezogen.

Nr.	Name	Verwendung	Sequenz 5'→3'
1	WAVE1-5'-Eco	Klonierung WAVE1	CGA ATT CAT GCT GCT GGT CAA AAG AAA CAT CGA TCC
2	WAVE1-3'-C2-Bam	Klonierung WAVE1	TGG ATC CCT TAC TCG AGC CAG TCT ACT TC
3	WAVE1-3'-N2-Bam	Klonierung WAVE1	CGG ATC CAC TCC AGC CAG TCT ACT TCA TCG
4	WAVE2-5'-Hind	Klonierung WAVE2	TCA AGC TTC TAT GCC GTT AGT AAC CAG G
5	WAVE2-3'-C1-Sal	Klonierung WAVE2	ACC GTC GAC TTA ATC CGA CCA GTC GTC TTC
6	WAVE2-3'-N3-Sal	Klonierung WAVE2	ACC GTC GAC ATC CGA CCA GTC GTC TTC ATC
7	WAVE3-5'-Eco	Klonierung WAVE3	CGA ATT CAT GCC ATT AGT CAA GAG AAA CAT C
8	WAVE3-3'-C2-Sal	Klonierung WAVE3	CGT CGA CCT CAG TCA GAC CAG TCA TTC
9	WAVE3-3'-N2-Sal	Klonierung WAVE3	CGT CGA CAG TCA GAC CAG TCA TTC TC
10	WAVE1-Seq-For	Sequenzierung	CAG AGG ACA AGA GGA AGG
11	WAVE1-Seq-Rev	Sequenzierung	GCT GCA ACT GCG ACA GG
12	WAVE2-Seq-For	Sequenzierung	CAG GAC ACC AAG GAT ATC
13	WAVE2-Seq-Rev	Sequenzierung	CAC CGC TGA AGG GGA G
14	WAVE3-Seq-For	Sequenzierung	GAT GCT GCA GGA CAC AG
15	WAVE3-Seq-Rev	Sequenzierung	GTG CTG TGG CCA GGA G
16	WAVE1-Seq-For2	Sequenzierung	CAT GAA CCA GAG AAA GTG C
17	WAVE1-Mut-For	Mutagenese	GTG TTT GTG AGC CCC ACT CCC CCA CC
18	WAVE1-Mut-Rev	Mutagenese	GGT GGG GGA GTG GGG CTC ACA AAC AC
23	mp53B_fw	Klonierung IRTKS	GCTAAGCTTATGTCTCGGGGGCCAGAGG
24	mp53B_oS	Klonierung IRTKS	CCTGGGATCCCATCGAATAATCGGTGCTGATC
25	mp53B_St	Klonierung IRTKS	CCCGGATCCCTTCATCGAATGATTGGTGCTG
26	p53B516	Klonierung IRTKS	CAC TCT GAC GAG AAG TAA CG
27	mp53seqf	Sequenzierung	GAC GTC TCG CCA GAG TG
28	p53C_Eco	Klonierung FLJ22582	GCG AAT TCA TGG CCC CCG AGA TG
29	p53C_C2	Klonierung FLJ22582	GAG GAT CCC TCA GCG AAT AAG TGG TGC
30	p53C_N2	Klonierung FLJ22582	CCG GAT CCA GCG AAT GAG GGG TGC
31	h53Cseqf	Sequenzierung	CCA ACA CCT TCC TGC AGT TC
32	h53Cseqr	Sequenzierung	GAG CTG AAC TCT CCC AGG
	M13 for	Sequenzierung	GTA AAA CGA CGG CCA G
	M13 rev	Sequenzierung	CAG GAA ACA GCT ATG AC
	pEGFP-C for	Sequenzierung	GGT CCT GCT GGA GTT CGT
	pEGFP-C rev	Sequenzierung	GGT GTG GGA GGT TTT TTA AAG C
	pEGFP-N for	Sequenzierung	CCA AAA TCA ACG GGA CTT TCC
	pEGFP-N rev	Sequenzierung	GGA CAC GCT GAA CTT GTG G

Tabelle 2.3: Oligonukleotide, die für PCR- sowie Sequenzierreaktionen verwendet wurden.

2.4.3 Expressed sequence tags (EST-Klone)

Die verwendeten EST-Klone wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bezogen.

WAVE1:	Maus; Clone ID : IMAGp998H159851Q (Subset Clone : IRAKp961B0225Q2); gi: 16877273
WAVE3:	Maus; Clone ID: IMAGp998I0211925Q (Subset Clone : IRAKp961F1653Q2); gi: 20071941
IRTKS:	Maus; Clone ID: IMAGp998C018764Q3 (Subset Clone: IRAPp968B0819D0); gi: 15930030
FLJ22582:	Human; Clone ID: IMAGp958B071679Q0 (Subset Clone: IRALp962O0133Q2); gi: 33874502

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Dabei gelingt der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen.

Die PCR-Reaktion besteht aus einem wiederholten Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension. Im ersten Schritt wird die DNA bei einer Temperatur von 94 bzw. 95°C denaturiert. Anschließend binden die im Überschuß zugegebenen Primer bei einer Temperatur zwischen 50°C und 65°C an die DNA-Stränge. Bei der Extension bindet dann eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. Die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt sich nach jedem Zyklus. Die spezifische DNA-Sequenz kann sich um den Faktor 10^5 - 10^7 bei 20-30 wiederholten Zyklen vermehren.

Bei der Auswahl der Primer ist zu beachten, dass die Differenz der Schmelztemperatur zwischen den eingesetzten Primern nicht größer als 2°C ist und bei ca. 60°C liegt. Die Anzahl der Nukleotide sollte 20-30 betragen und der GC-Gehalt bei ca. 50% liegen. Um eine stabile Bindung zwischen DNA und Primer zu ermöglichen, sollten die beiden endständigen Nukleotide Cytosin oder Guanin sein, da diese im Gegensatz zu Adenin und Thymin drei Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden.

Bei Guanin-/Cytosin-reichen Sequenzen stellt sich oft das Problem, dass die DNA-Denaturierung bei 95°C nicht vollständig ist. Daher wurde bei manchen PCR-Ansätzen 2-4 % DMSO hinzugefügt. DMSO hat denaturierende Wirkung.

Allgemeiner PCR-Ansatz :

DNA	0,1- 0,2 µg
dNTP-Mix (TaKaRa)	0,8 mM
Oligonukleotid-Primer	10 pM

10 x cloned Pfu-Puffer (Stratagene)	5 µl
PfuTurbo [®] -Polymerase (Stratagene)	2-3 U
(DMSO	2-4 %)
H ₂ O	ad 50 µl

Geräte: PTC-200 DNA Engine Multicycler (Biozym / MJ Research)
T3 Thermocycler (Biometra[®])

2.4.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA-Moleküle lassen sich mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen sequenz-spezifisch spalten. In Abhängigkeit von der erkannten und geschnittenen DNA-Sequenz entstehen dabei glatte Enden („blunt ends“) oder durch einen asymmetrischen Schnitt Enden mit überstehender einzelsträngiger DNA („sticky ends“). Mit Restriktionsenzymen kann man DNA-Moleküle in reproduzierbare Fragmente zerlegen, die dann z.B. durch Agarosegelelektrophorese analysiert werden können (s. Kapitel 2.4.6).

Restriktionsendonukleasen binden enzyspezifisch an meist palindromartig angeordnete Erkennungssequenzen und schneiden innerhalb dieser Sequenz die DNA durch Spaltung zweier Phosphodiester-Bindungen.

Die verwendeten Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs oder MBI Fermentas.

Allgemeiner Restriktionsansatz:

DNA	
10x Restriktionspuffer	Endkonzentration 1x
Restriktionsenzym	2 – 30 U (max. 1/10 Volumen)
MilliQ-/Baker-H ₂ O	ad 15-100 µl

Der Restriktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Aufreinigung, Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym oder Zugabe von DNA-Ladepuffer abgestoppt. Das im Ladepuffer enthaltene EDTA chelatiert für die Enzyme notwendige zweiwertig-positiv geladene Ionen, so dass die Enzyme nicht mehr funktionsfähig sind.

2.4.6 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren lassen sich ihrer Größe entsprechend in einem elektrischen Feld in einer Gelmatrix auftrennen. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Weitere Faktoren, die die Geschwindigkeit der DNA/RNA-Wanderung bestimmen, sind die Stromstärke des elektrischen Feldes, die Pufferbedingungen und die Agarose-Konzentration. Das Verfahren wird sowohl zu analytischen als auch präparativen Zwecken eingesetzt. Um die Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, wird der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, der nach Interkalation in die DNA-Moleküle unter UV-Licht rötlich fluoresziert. Die Größen der DNA-Banden können durch den Vergleich mit einem entsprechenden Marker festgestellt werden.

Für DNA-Gele wurde SeaKem®LE Agarose (BioWhittaker Molecular Applications, USA) mit einer Endkonzentration von 0,8-2 % in 1X TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben und die Lösung in einen Elektrophoreseschlitten mit Kamm gegossen.

Nach Erkalten wurde das Gel in eine Gelkammer überführt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Der Kamm wurde entfernt, die Proben mit 1/5 Volumen 5x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Standard-Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50-80 V. Nach Anlegen des elektrischen Feldes wandert die negativ geladene Nukleinsäure auf den positiven Pol zu. Nach ausreichender Trennung der DNA-Fragmente wurde das Ergebnis photographisch festgehalten.

<i>5x DNA-Ladepuffer:</i>	Ficoll	15% (v/v)
	EDTA pH 8	50 mM
	SDS	0,5 % (w/v)
	50x TAE-Puffer pH 7.5	20 µl
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
	Xylencyanol FF	0,05 % (w/v)
	H ₂ O	ad 1 ml
<i>50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA):</i>	Tris-Base	2 M (pH 7,5)
	Na-Acetat	1 M
	EDTA	50 mM

DNA-Marker : SmartLadder (Eurogentec)

Geräte: Gelkammer (Gibco-BRL; BIO-RAD) und Power-Supply (BIO-RAD PowerPac 200/300)

2.4.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel:

Der PCR- oder Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende DNA-Bande möglichst exakt aus dem Gel ausgeschnitten und mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) oder „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aus dem Gel eluiert und aufgereinigt.

Aufreinigung von PCR-Produkten:

Um PCR-Ansätze von Reaktionsrückständen, Enzymen und Primern zu reinigen, wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet.

2.4.8 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Religation eines mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektors zu verhindern, wird dieser mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Das Enzym spaltet die Phosphat-Gruppe an den 5'-Enden der Vektor-DNA ab. Nur der Einbau eines phosphorylierten Inserts ermöglicht dann das Schließen des Vektors.

Reaktionsansatz:

Plasmid-DNA	x µg (Menge variabel)
10x Dephosphorylierungspuffer	Endkonzentration 1x
Alkalische Phosphatase	1 µl

Die „Shrimp Alkalische Phosphatase“ (SAP) wurde von Roche bezogen, der 10x Dephosphorylierungspuffer setzte sich aus 0,5 M Tris-HCl und 50 mM MgCl₂ zusammen.

Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37°C inkubiert, gefolgt von der Inaktivierung der SAP (15 min bei 65°C).

Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese und nachfolgender „QIAEX II Gel Extraction“ (Qiagen) gereinigt.

2.4.9 Ligation von DNA

Bei der Ligation wird der dephosphorylierte Vektor mit einem DNA-Fragment durch eine T4-DNA-Ligase verbunden. Die Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen den benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden. Der Vektor sowie das DNA-Fragment wurden vorher mit den selben oder kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Konzentration mittels Agarosegelelektrophorese abgeschätzt. Die Insert-DNA wurde in etwa dreifachem Überschuss mit der Vektor-DNA ligiert.

Ligationsansatz:

Vektor-DNA	50-100 ng
Insert-DNA	3x Menge der Vektor-DNA
10x Ligase-Puffer	1 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl (1 U/µl)
H ₂ O	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgte in einem Eiswasserbad, das sich über Nacht erwärmte und somit einen Temperaturgradienten durchlief. Anschließend wurde die Hälfte des Ligationsansatzes für die Transformation von kompetenten *E. coli* verwendet.

2.4.10 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Vor der Transformation müssen die Bakterien in einen für die Aufnahme von Plasmid-DNA „kompetenten“ Zustand überführt werden. Hierbei wird die Bakterienoberfläche derart verändert, dass die Fremd-DNA daran binden und aufgenommen werden kann. Die Kompetenz wird bei *E.coli* durch Inkubation der Bakterien aus der früh log-Phase in Calcium- oder Rubidiumchlorid erreicht.

Calciumchloridmethode

Eine Übernachtskultur von *E.coli* TG2 wird in 300 ml LB-Medium 1:100 verdünnt, bis zu einer $OD_{600nm} = 0,5$ bei 37°C inkubiert und mittels Zentrifugation (5-10 min, 5500 x g, 4°C) geerntet. Das Pellet wird in 60 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation werden die Bakterien in 1,5-3 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und wiederum auf Eis gehalten (3 h). Nach Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin werden die kompetenten Zellen in 100 µl Aliquots bei -70°C eingefroren.

Rubidiumchloridmethode

Ausgehend von einer Übernachtskultur werden *E. coli* TG2 Bakterien 1:100 auf 300ml LB-Medium (inkl. 1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 0,9 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) verdünnt und bis zur frühen log-Phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$) bei 37°C inkubiert. Nach Ernte mittels Zentrifugation (5 min bei 4500 x g) wird das bakterielle Pellet in 120 ml TFB1 resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Bakterien in 12 ml TFB2 resuspendiert, 60 min auf Eis gehalten und anschließend in 100 µl Aliquots bei –70°C gelagert.

TFB1: 30 mM Kalium-Acetat

10 mM CaCl_2

50 mM MnCl_2

100mM RbCl

15% Glycerin

→ pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

TFB2: 10 mM MOPS, pH 6,5

75 mM CaCl_2

10 mM RbCl

15% Glycerin

→ pH 6,5 mit KOH einstellen

Die Lösungen werden sterilfiltriert und bei RT aufbewahrt.

2.4.11 Transformation von *Escherichia coli*

Das Einbringen von Fremd-DNA in kompetente *E.coli* wird Transformation genannt. Hierbei werden die Bakterien mit der Fremd-DNA (meist Plasmid-DNA) gemischt, wobei Kompetenz-Faktoren auf der bakteriellen Oberfläche die DNA binden. Durch einen kurzen Hitzeschock wird die Membran destabilisiert, so dass die DNA in das Zytoplasma der *E.coli* gelangen kann. Durch die Plasmid-DNA erhalten transformierte Bakterien eine Antibiotika-resistenz, so dass man sie durch anschließende Kultivierung auf entsprechenden Agarplatten selektieren kann.

100 µl kompetente *E.coli* TG2 werden langsam auf Eis aufgetaut, mit 50-200 ng DNA gemischt und für 30 min auf Eis gehalten. Ein Hitzeschock (42°C, 30 s) bewirkt, dass die DNA aufgenommen wird. Direkt im Anschluss werden 300 µl SOC-Medium hinzugegeben. Im Falle einer Kanamycin-Resistenz wird der Ansatz dann für 1h bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Abschließend werden die transformierten Bakterien auf Agarplatten mit entsprechendem Selektivmedium ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.4.12 TOPO-Klonierung

Um PCR-Fragmente ohne vorherige Modifikation in einen Vektor einzubringen, wurden sie in die Vektoren pCR[®]4Blunt-TOPO und pCR[®]-Blunt II-TOPO (Invitrogen) kloniert.

Die linearisierten TOPO-Vektoren verfügen über das kovalent gebundene Enzym Topoisomerase I aus *Vaccinia* an beiden 3'-Enden. Topoisomerase I bindet doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und führt letztlich zur kovalenten Bindung des PCR-Produktes und zur Abspaltung des Enzyms. Dabei unterbricht ein PCR-Fragment den ORF („open reading frame“) des LacZ-Gens und macht es funktionslos. Bakterien, die nur den religierten Vektor enthalten, exprimieren dagegen ein funktionsfähiges LacZ. Zusammen mit genomisch kodierten Proteinen setzt es das im Medium enthaltene X-Gal (nach Induktion mit IPTG) zu einem blauen Farbstoff um, der die Kolonien kennzeichnet. In der Regel reichte eine Antibiotika-Selektion positiver Klone aus, so dass die Möglichkeit der beschriebenen Blau/Weiß-Selektion nicht genutzt wurde.

Mit Pfu-Polymerasen synthetisierte DNA-Fragmente zeichnen sich durch das Vorhandensein von glatten Enden aus. Die linearisierten TOPO-BLUNT-Vektoren sind für diese PCR-Produkte konzipiert, da sie ebensolche Enden besitzen.

Reaktionsansatz:

PCR-Produkt	4 µl
Salzlösung (Invitrogen)	1 µl
TOPO-Vektor (Invitrogen)	1 µl

→ 15 min bei RT inkubieren

Anschließend wurden 2 µl des Reaktionsansatzes in 10 µl kompetente *E.coli* Top10 transformiert (s. Kapitel 2.4.11).

2.4.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Minipräparation

Zur Isolierung analytischer Plasmidmengen wurde die Plasmid-DNA über eine Fiberglasmatrix des GFX[™] Micro Plasmid Prep Kits (Amersham Pharmacia Biotech) laut Herstellerangaben aufgereinigt.

Maxipräparation

Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wurde die Plasmid-DNA nach QIAGEN Plasmid Maxi Protocol (Qiagen) mit QIAGEN-tip 500 über eine Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Die isolierte DNA wurde bei -20°C in 10mM Tris/CL, pH 8.5 gelagert.

2.4.14 Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA

DNA zeigt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ ein Absorptionsmaximum. Zur Konzentrationsermittlung wird ein Aliquot der DNA so mit MilliQ- H_2O verdünnt, dass die Extinktion dieser Lösung im linearen Bereich liegt ($\text{OD}_{260\text{nm}} = 0,1-1$). Nach Messung der optischen Dichte kann die Konzentration der Lösung bestimmt werden (hierbei entspricht $\text{OD}_{260\text{nm}} = 1$ einem Gehalt von $50 \mu\text{g/ml}$ an doppelsträngiger DNA):

$$(\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50) / 1000 = c_{\text{DNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Photometer: Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotec)

2.4.15 Mutagenese

Der WAVE1-EST-Klon (s. Kapitel 2.4.3) enthielt verglichen mit der publizierten NCBI-Sequenz eine Mutation (P324S). Um diese Mutation zu beseitigen, wurde mit Hilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) ein Aminosäureaustausch durchgeführt, um das eigentliche Prolin an dieser Stelle zurück zu erhalten.

Das Prinzip der Site-Directed Mutagenesis besteht aus spezifischen Primern, die die entsprechende Mutation enthalten, einer PCR mit der PfuTurbo[®]-DNA-Polymerase und anschließendem Verdau der Ausgangs-DNA mit der Endonuklease DpnI. DpnI erkennt dabei spezifisch die durch *E.coli* methylierte Ausgangs-DNA, aber nicht die einen „nick“ enthaltende DNA mit der gewünschten Mutation.

Nach PCR und DpnI-Verdau wurde die erhaltene DNA wie unter 2.4.11 beschrieben in *E.coli* transformiert. Die „Rückmutation“ im WAVE1 wurde abschließend mittels Sequenzierung überprüft.

2.4.16 DNA-Sequenzierung

Die von Sanger entwickelte Methode zur enzymatischen Sequenzierung von DNA-Fragmenten basiert auf der Verwendung von Dideoxynukleotiden als Analoga zu den Deoxynukleotiden. Durch den zufälligen Einbau der Dideoxynukleotide mittels PCR kommt

es zum Kettenabbruch der DNA-Synthese, da durch das Fehlen der OH-Gruppe am 3'-C-Atom die Ausbildung der nächsten Phosphodiester-Bindung verhindert wird.

Die vier verwendeten Dideoxynukleotide sind mit verschiedenartigen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die Fragmente bei Anregung mit einem Laserstrahl unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen. Das entstandene DNA-Gemisch wird gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Laseranregung in einem computer-gestützten, automatischen Verfahren die Nukleotidsequenz der DNA ermittelt.

Zur Sequenzierung wurde der Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Reaktionsansatz:

DNA	0,5 µg
Primer	3,2 pmol
Sequenzierpuffer	1 µl
Big Dye v3.1	2 µl
H ₂ O	ad 10 µl

PCR-Programm:

1 Zyklus	96 °C	5 min
25 Zyklen	96 °C	15 s
	50-55 °C	15s
	60 °C	4 min
1 Zyklus	4 °C	∞

Die Analyse der Fragmente wurde von der Firma GATC Biotech AG in „single-read“-Genauigkeit vorgenommen. Zur Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen wurde die Software DNASTAR benutzt.

2.4.17 Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA

Zur Isolierung von RNA wurde eine konfluent bewachsene 10 cm-Platte der jeweiligen Zelllinie mit PBS gewaschen, mit 3 ml Tri-Reagenz (SIGMA) überschichtet und damit abgespült. Jeweils 1 ml wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in denen 100 µl Chloroform vorgelegt waren. Dieses Gemisch wurde für 30 s geschüttelt, dann für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 12000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen, auf 500 µl Isopropanol pipettiert und zum Fällern der RNA für 6-12 Tage bei -70°C gelagert.

Die gefällte RNA wurde bei 12000 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75%-igem Ethanol gewaschen und nochmals bei 7500 x g und 4°C für 8 min zentrifugiert. Die Pellets jeder Zelllinie wurden gepoolt und in insgesamt 40 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Abschließend wurde die Konzentration ($c \text{ [}\mu\text{g}/\mu\text{l]} = (\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40)/1000$) und der Reinheitsgrad ($R = \text{OD}_{280} / \text{OD}_{260} > 1,9$) jeder RNA-Präparation bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70 °C.

2.4.18 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zur Herstellung komplementärer DNA aus RNA wurde das Superscript II Kit (Gibco) mit folgenden Ansätzen verwendet:

<i>Ansatz A</i>	RNA	3 µg
	OligoDT	1 µl
	dNTP (10 mM)	2,5 µl
	DEPC-H ₂ O	ad 25 µl

→ Ansatz A wurde auf Eis zusammenpipettiert, dann für 5 min bei 65 °C inkubiert, auf 50 °C abgekühlt und mit Ansatz B vermischt.

<i>Ansatz B</i>	10x RT-Puffer	5 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	10 µl
	DTT (0,1 M)	5 µl
	Rnase OUT	1 µl
	DEPC-H ₂ O	ad 25 µl

Zu dem Gesamtansatz von 50 µl wurde 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase gegeben und für 50 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen Temperaturwechsel auf 70°C (15 min) gestoppt und dann auf Eis überführt. Durch Zugabe von 1 µl RNase H wurde die restliche RNA für 20 min bei 37°C verdaut. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

PCR-Ansatz

dNTPs	1 µl
Primer	je 10 pmol
cDNA	2 µl
Taq-Polymerase	0,75 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

<i>PCR-Program:</i>	1 Zyklus	94°C	3 min
	30 Zyklen	94°C	30 s
		65/63°C	1 min
		72°C	1 min
	1 Zyklus	72°C	7 min
	1 Zyklus	4°C	∞

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und sorgt für eine Anlagerung negativer Ladungen mit einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine zur Kathode. Dabei trennt die Polyacrylamid-Matrix das Proteingemisch nach seiner Größe auf.

Für die SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen (Biometra®) mit 1 mm dicken „Spacern“ verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit ¼ Volumen 4x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Als Molekulargewichtsmarker dienten PageRuler™ Protein Ladder, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas) oder ein vorgefärbter Kaleidoskop-Marker (Bio-Rad).

Für die Fokussierung im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt, zur Auftrennung der Proben im Trenngel wurde die Spannung auf 160-180 V erhöht. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

4x Probenpuffer

4 ml	10% (w/v) SDS-Lösung
600 µl	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
4 ml	Glycerin
400 µl	β-Mercaptoethanol
200 µl	5% (w/v) Bromphenolblau
2,8 ml	H ₂ O

Elektrophoresepuffer

25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin

	0,1%	SDS (w/v)
<i>Acrylamidlösung</i>		
	30%	Acrylamid (w/v)
	0,8%	N,N-Methylenbisacrylamid (w/v)

→ Es wurde die fertige Stammlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth) verwendet.

Sammelgel (5%)

1,8 ml	H ₂ O
320 µl	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
330 µl	Acrylamidlösung
25 µl	10% SDS-Lösung
12,5 µl	TEMED
12,5 µl	25% APS (w/v)

Trenngel

7,5%	10%	
3 ml	2,5 ml	H ₂ O
1,5 ml	1,5 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
1,5 ml	2 ml	Acrylamid
60 µl	60 µl	10% SDS
8 µl	8 µl	TEMED
8 µl	8 µl	25% APS (w/v)

2.5.2 Coomassie-Färbung

Das Gel bzw. die PVDF-Membran wurde 30-60 min in der Färbelösung geschwenkt, anschließend kurz mit Wasser gespült und solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

Coomassie-Färbelösung

0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)
25 % (v/v)	Isopropanol
10 % (v/v)	Essigsäure
65 % (v/v)	H ₂ O

Coomassie-Entfärber

10 % (v/v)	Essigsäure
------------	------------

40 % (v/v) Methanol

50 % (v/v) H₂O

2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen

Zur photometrischen Bestimmung einer Antikörperkonzentration wurde die Absorption einer Probe bei 280 nm gegen den Puffer, in welchem sich der Antikörper in Lösung befindet, gemessen. Die erhaltene optische Dichte (OD) wird mit dem Faktor 0,8 multipliziert, um die Antikörperkonzentration in mg/ml zu errechnen:

$$OD_{280nm} = 1,0 = 0,8 \text{ mg/ml} = c_{\text{Antikörper}}$$

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 Primäre Antikörper

Name	Protein	Spezies	Herkunft	Verwendung
101G4B2	GFP	Maus (mc)	Dieses Labor	WB
270F3	GFP	Maus(mc)	Dieses Labor	WB
α Pan-WAVE	WAVE	Kaninchen (pc)	Innocenti et al., 2004	WB; IF
α IRSp53	IRSp53	Kaninchen (pc)	Nakagawa et al., 2003	WB
5058	IRSp53	Kaninchen (pc)	Dieses Labor	WB
5065	WAVE1	Kaninchen (pc)	Diese Arbeit	WB
5062	WAVE3	Kaninchen (pc)	Diese Arbeit	WB
α Tubulin (α 3A2)	Tubulin	Maus (mc)	Ascites; Frankreich	WB
9E10	C-myc	Maus (mc)	ATCC	WB
5502	WAVE2	Kaninchen (pc)	Diese Arbeit	WB
5498 2B	IRTKS	Kaninchen (pc)	Diese Arbeit	WB
P7[KE]	M45	Maus (mc)	Wolf-Dietrich Hardt; Zürich	IF
K52	Listeriolysin	Kaninchen (pc)	Dieses Labor	IF
α Salmonella	<i>Salmonella typhimurium</i>	Kaninchen (pc)	Wolf Dietrich Hardt; Zürich	IF
α Aktin (A-5060)	Aktin	Kaninchen (pc)	SIGMA	WB
7170	FLJ22582	Kaninchen (pc)	Diese Arbeit	WB
323H3	p16 (Arp2/3-Komplex)	Maus (mc)	Dieses Labor	IF

Tabelle 2.4: Verwendete / generierte primäre Antikörper (WB= Western Blot; IF= Immunfluoreszenz)

2.6.2 Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Subklasse	Konjugat	Herkunft	Verwendung
A4a	Ziege-anti-Maus	IgG/IgM	HRP	Dianova	WB 1:2000
B4c	Ziege-anti-Kaninchen	IgG/IgM	HRP	Dianova	WB 1:2000
G4c	Esel-anti-Ziege	IgG	HRP	Dianova	WB 1:2000
A12c	Ziege-anti-Maus	IgG	Alexa Fluor™ 488	Molecular Probes	IF 1:400
B12c	Ziege-anti-Kaninchen	IgG	Alexa Fluor™ 488	Molecular Probes	IF 1:400
A13c	Ziege-anti-Maus	IgG	Alexa Fluor™ 594	Molecular Probes	IF 1:400
B13c	Ziege-anti-Kaninchen	IgG	Alexa Fluor™ 594	Molecular Probes	IF 1:400
A16c	Ziege-anti-Maus	IgG	Alexa Fluor™ 380	Molecular Probes	IF 1:400
B16c	Ziege-anti-Kaninchen	IgG	Alexa Fluor™ 380	Molecular Probes	IF 1:400

Tabelle 2.5: Verwendete sekundäre Antikörper (HRP= „Horse radish peroxidase“, WB= Western Blot; IF= Immunfluoreszenz)

2.6.3 Western Blot

Der Western Blot erlaubt den spezifischen Nachweis von Proteinen. Durch SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennte Proteine werden dabei auf eine feste Matrix transferiert. Der Proteintransfer wurde im „semi-dry“-Verfahren mit einer Polyvenylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) durchgeführt.

Die Membran wurde vor dem Transfer in Methanol aktiviert und anschließend wie das SDS-Gel sowie 4 Lagen auf Gelgröße zurechtgeschnittenes Whatman-Papier in Blotpuffer äquilibriert. Die einzelnen Lagen wurden wie folgt luftblasenfrei auf die Kathode geschichtet:

2 Lagen Whatman-Papier

SDS-Gel

Membran

2 Lagen Whatman-Papier als direkter Abschluss zur Anode.

Der Transfer erfolgte für 1-2 h bei 120-150 mA. Der Nachweis des Proteins von Interesse wurde mit spezifischen Antikörpern erzielt.

Blotpuffer

50 mM	Tris-Base
39 mM	Glycin
0,037 %	SDS (w/v)
20 %	Methanol (v/v)

2.6.4 Immunfärbung und Chemolumineszenz

Die geblottete Membran wurde für 30 min bei RT mit 0,03 % Milch (in TBS-T) abgesättigt. Als Primärantikörper wurden Kulturüberstand von Hybridomzellen, Seren oder aufgereinigte Antikörper in geeigneter Verdünnung (ca. 1-2 µg/ml) eingesetzt. Die Sekundärantikörper waren Peroxidase-gekoppelt (horse radish peroxidase, HRP). Es wurde jeweils 1h bei RT in 0,03%-Milch inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran für jeweils 10 min mit TBS-T, TBS-T + 0,1 M NaCl und TBS-T + 0,5% Triton X-100 gewaschen und wieder in TBS-T überführt.

TBS-T

20 mM	Tris-Base (pH 7,6)
137 mM	NaCl
0,1%	Tween 20 (v/v)

Die Chemolumineszenz ist ein hochsensitives Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen. Das Prinzip beruht auf der Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ durch die an die Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Das dabei entstehende Licht wird über einen Röntgenfilm gemessen.

Das Lumi-Light-Substrat (Western Blotting Substrate, Roche) wurde gemäß Herstellerangaben aus zwei Komponenten gemischt. Die gewaschene Membran wurde für 1 min bei RT mit der Lösung inkubiert, abgetropft und zwischen zwei Folien eingeschlagen. Auf der Membran wurde ein Röntgenfilm (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences) 1 bis 300 s exponiert. Abschließend wurde der Film in einer Entwicklermaschine (Curix 60, Agfa) entwickelt.

2.6.5 Generierung polyklonaler Antikörper

Die Generierung polyklonaler Antikörper wurde von der Firma BioGenes (Berlin) durchgeführt. Es wurden dafür je zwei 2-6 Monate alte Kaninchen (ZIKA) parallel immunisiert.

Das ausgewählte Peptid wurde vor der Immunisierung unter Verwendung des „Imject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit“ (Pierce) an Ovalbumin gekoppelt, da Peptide selbst zu klein sind, um eine ausreichende Immunantwort zu erzeugen. Dazu wurden 2-3 mg Peptid in 200 µl Konjugationspuffer (Kit Pierce) sowie 2 mg aktiviertes Ovalbumin in 200 µl deionisiertem Wasser gelöst. Die Peptidlösung wurde sofort zur Ovalbuminlösung gegeben und für 2h bei RT auf einem Überkopfschüttler inkubiert.

Es wurde mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und das gekoppelte Peptid zur Kaninchen-Immunisierung an BioGenes geschickt.

Peptide zur Immunisierung

<i>IRSp53(murin/human)</i>	C-KKLRKKSQGSKNPQKYSDKEL-NH ₂
<i>IRTKS (murin/human)</i>	C-KDYDTLSKYSPKMPPAPSVK-NH ₂
<i>FLJ22582 (human)</i>	C-RMERKRDKNVREMKESVNR-NH ₂
<i>WAVE1 (murin)</i>	C-GAGDAKPTPTCISSATGLIENRPQ-NH ₂
<i>WAVE2 (murin/human)</i>	C-EKKDNPNRGNVNPRKIKTRKEEWEKM-NH ₂
<i>WAVE3 (murin)</i>	C-LRPDNRLSQSVHHGASSEGLSPDTR-NH ₂

2.6.6 Reinigung polyklonaler Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Zur Herstellung der Affinitätssäule wurden 2 g CNBr-aktivierte SepharoseTM 4B (Amersham Biosciences) in Pulverform mit 100 ml H₂O, 200 ml 5 mM HCl sowie 200 ml Boratpuffer auf einer Glasfritte gewaschen. Währenddessen wurden 10 mg Peptid in 1 ml Boratpuffer gelöst. Peptid und Sepharose wurden in einem 15 ml Röhrchen vereinigt und mit Boratpuffer auf ca. 14 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Dann wurde für 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert, das Säulenmaterial dreimal mit 1,5 M HCl (pH 8,8) gewaschen und für 1h bei RT rotierend damit inkubiert. Anschließend wurde das Material auf eine PD-10 Säule (Amersham Biosciences) gegeben und einmal mit PBS gewaschen.

25 ml des Kaninchenserums wurden dreimal auf die Säule gegeben, die danach mit 100 ml PBS gewaschen wurde. Es erfolgte die Elution mit Vorwasch- bzw. Elutionspuffer, wobei Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen wurden, die zudem durch Zugabe von 100 µl Tris-HCl (pH 8,8) neutralisiert wurden.

Die polyklonalen Antikörper wurden photometrisch (OD_{280nm}) vermessen und die Fraktionen mit den höchsten Absorptionen gepoolt. Mittels Falcon-Konzentratoren (Vivaspin 10 000 MWCO, VIVAScience) wurde die Antikörperlösung auf 1-2 ml aufkonzentriert und ebenfalls in den Konzentratoren mit PBS umgepuffert.

Abschließend wurde nochmals die optische Dichte bei 280 nm bestimmt, um die Antikörperkonzentration zu ermitteln. Die Antikörper wurden bei 4°C unter Zugabe von NaN₃ gelagert.

Boratpuffer (pH 8,4)

0,1 M Borsäure

0,5 M NaCl

Vorwaschpuffer (pH 4,8)

0,1 M Na-Acetat

0,5 M NaCl

0,1 M Essigsäure

Elutionspuffer (pH 2,5)

0,2 M Na-Acetat

0,5 M NaCl

0,2 M Essigsäure

2.6.7 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden konfluente Zellen einer 10 cm-Kulturschale verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, auf Eis gestellt und in 500 µl IP-Puffer mit oder ohne Triton-X100 (Sigma) lysiert. Dann wurde das Zelllysats mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale gelöst. Der Ansatz ohne Detergenz wurde durch dreimalige Ultraschall-Behandlung (10 s) und wiederholtes Vortexen aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde für 10-15 min auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert (15000 x g, 10 min, 4°C).

Der Überstand wurde für die IP mit 5 µg des entsprechenden Antikörpers versetzt und für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl Protein-G-Sepharose (Amersham) wurde eine weitere Stunde inkubiert. Durch Zentrifugation (1000 x g, 2 min, 4°C) wurde die Sepharose pelletiert und nach dreimaligem Waschen mit IP-Puffer in 40 µl 4 x Probenpuffer aufgenommen.

IP-Puffer:

8	mM	Tris-Base
12	mM	HEPES
50	mM	NaCl
15	mM	KCl
5	mM	MgCl ₂
20	mM	NaF
1	mM	ATP
1	mM	Na ₃ VO ₄

1	%	PEG 6000
(1	%	Triton-X100)
1		Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail Tablette (Roche)

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Standardkultur

Die Zellen wurden in sterilen Gewebekulturschalen (Corning, Falcon, Nunc) mit den Durchmessern 100 mm, 60 mm, 35 mm in 10 ml, 4 ml bzw. 2 ml des jeweiligen Mediums kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank (NuaireTM IR Autoflow) bei 37°C in einer 7%igen (v/v) CO₂-Atmosphäre bzw. für die Zelllinien Klon1 und 1H51 bei 32°C und 5% (v/v) CO₂.

2.7.2 Passagieren von Zellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz durch enzymatisches Aufbrechen der Zell-Matrix-Verbindungen (mit Trypsin/EDTA) vom Boden der Kulturschale abgelöst und verdünnt in eine neue Kulturschale wieder ausgesät.

Die Zellen wurden zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen und solange in Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich der Großteil der Zellen sichtbar abgerundet hatte. Dann wurden sie mit einer Pipette abgespült, vereinzelt und mit frischem, vorgewärmten Medium verdünnt. Nachfolgend wurden sie abzentrifugiert (Heraeus), in frischem Medium resuspendiert und in einer neuen Kulturschale ausgesät.

Trypsin/EDTA: 0,5 mg/ml Trypsin und 0,2 mg/ml EDTA in modifizierter „Puck's Saline“ (Gibco) bzw. in PBS (PAA)

2.7.3 Kultur auf Deckgläschen

Zur mikroskopischen Beobachtung (siehe Kapitel 2.8.1 und 2.8.2) wurden die Zellen ca. 24 h auf vorbehandelten Deckgläschen kultiviert.

Zur Beseitigung von störenden Unreinheiten wurden die Deckgläschen in einer Lösung aus 60% Ethanol und 40% HCl 20 min gereinigt, mehrmals gründlich mit deionisiertem und

MilliQ-H₂O gewaschen und einzeln getrocknet. Die Sterilisation erfolgte mittels Autoklavieren (121°C, 30 min).

Die Zellen wurden auf unterschiedlichen Substraten ausgesät, um die Ausbildung verschiedener zellulärer Strukturen zu induzieren bzw. zu unterstützen. Für einige Zelllinien können mehrere Substrate gewählt werden, wohingegen bei anderen nur eines in Frage kommt, da diesen Zellen die Rezeptoren für andere Substrate fehlen. Bei manchen Zellen z.B. bewirkt das Aussäen auf Laminin die Stimulierung von Lamellipodien während Fibronektin als Substrat die Ausbildung von Stressfasern und Fokalkontakten verstärkt. Die verschiedenen Substrate haben überdies Auswirkungen auf die Zellmotilität.

Die Deckgläser (12 mm für fixierte Zellen, 15 mm für Videomikroskopie lebender Zellen) wurden mit 100 µl Laminin (Sigma, 25 µg/ml) in Laminin-Puffer (50 mM Tris / 150 mM NaCl) beschichtet. Fibronektin (Roche, in 2 M Harnstoff gelöst) wurde mit einer Konzentration von 50 µg/ml (in PBS) eingesetzt. Die Beschichtung erfolgte für je 1 h bei RT. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Wachstumsmedium bedeckt.

2.7.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abtrypsinisiert, in Medium resuspendiert und abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min). Das Zellpellet wurde in kaltem Kulturmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) resuspendiert und die Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert (je 1 ml). Die Röhrchen wurden kurzfristig bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in Kryoröhrchen im 37°C-Wasserbad erwärmt, in kaltes DMEM überführt und abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min). Das Zellpellet wurde in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen ausgesät.

2.7.5 Transfektion eukaryotischer Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA (hier insbesondere Plasmid-DNA) in eukaryotische Zellen. Im Komplex mit den Transfektionsreagenzien wird dabei die Plasmid-DNA durch die Zellmembran in die Zellen eingeschleust.

Die zu transfizierende DNA wurde durch Plasmidpräparation aufgereinigt (siehe Kapitel 2.4.14). Die Zellen wurden einen Tag zuvor so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50-80% erreicht hatten.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet: FuGENE 6 (Roche) sowie SuperFect[®] (Qiagen).

FuGENE-Transfektionsansatz (für eine 3 cm-Kulturschale):

47	μl	Medium (ohne Zusätze)
3	μl	FuGENE 6
1	μg	DNA

Der Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert. Das Wachstumsmedium der Zellen wurde gegen frisches ersetzt, dann wurde der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Transfektionszeit betrug 16-48 h.

SuperFect[®]-Transfektionsansatz (für eine 3 cm-Kulturschale)

300	μl	Medium (ohne Zusätze)
6	μl	SuperFect [®]
1-2	μg	DNA

Der Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert und schließlich mit Standardmedium auf das gewünschte Volumen aufgefüllt (hier: 2 ml). Das alte Medium wurden von den Zellen abgesaugt und durch den Transfektionsansatz ersetzt. Die Transfektionszeit betrug 16 h.

Für einige Experimente wurden die transfizierten Zellen nach ihrer GFP-Expression mittels FACS von Lothar Gröbe (GBF) sortiert.

2.7.6 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Extrakten aus Zelllinien wurden pro konfluent bewachsener 10 cm-Kulturschale 300-500 μl 4x Probenpuffer (s. Kapitel 2.5.2) verwendet. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, durch Zugabe des Probenpuffers lysiert und im Anschluss mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner) von der Kulturschale geschabt. Die Lagerung erfolgte bei - 20°C.

2.7.7 Gentamycin Protection Assay

Der Gentamycin Protection Assay dient der Messung der Invasionseffizienz von bakteriellen Pathogenen in eukaryotische Zellen. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der limitierten Penetration des Aminoglykosid-Antibiotikums Gentamycin in eukaryotische Zellen. Bakterien, die die zelluläre Membran überwunden haben und sich intrazellulär befinden, sind

so vor der bakteriziden Wirkung des Gentamycins geschützt, während extrazellulär befindliche Pathogene schnell durch das Antibiotikum abgetötet werden (Elsinghorst, 1994).

Vorarbeiten

24-48 h vor Durchführung des Assays wurden die verwendeten Zellen mit einer Dichte von $\sim 5 \cdot 10^4$ Zellen pro Loch in einer 24-Loch-Kulturschale ausgesät. Nach Möglichkeit wurde bereits hier Wachstumsmedium ohne Antibiotika-Zusatz verwendet. Des weiteren wurde 5 ml des entsprechenden Bakterienkulturmediums mit dem jeweiligen Bakterium angeimpft und ü.N. (~ 16 h) bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die verwendeten Bakterienstämme sowie die dazugehörigen Kulturmedien sind in Kapitel 2.2.1-2.2.3 aufgeführt.

Infektion

Im Falle von *Salmonella typhimurium* wurde die ü.N.-Kultur nochmals 1:33 in frischem Medium verdünnt und für weitere 3 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Von der Bakteriensuspension wurde 1 ml abgenommen, zentrifugiert (3000 rpm, 3 min) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 1 ml des entsprechenden Zellkultur-Wachstumsmediums (ohne P/S; im Falle von *Listeria monocytogenes* auch ohne Serum) resuspendiert und 1:100 darin verdünnt auf die Zellen gegeben. Die Bakterien wurden auf die Zellen zentrifugiert (1900 rpm, 4 min), um die Infektion zu starten und zu synchronisieren. Die Infektionszeit betrug 20 min (*Salmonella typhimurium*), 1h (*Listeria monocytogenes*) bzw. 1,5 h (*Shigella flexneri*) und wurde in einem Brutschrank (NuaireTM DH Autoflow) bei 37°C und 7,5%iger CO₂-Atmosphäre durchgeführt.

Postinfektion

Die infizierten Zellen wurden zweimal mit PBS sowie einmal mit Postinfektionsmedium (Zellkulturmedium ohne P/S, + 50 µg/ml Gentamycin) gewaschen und mit diesem Medium für weitere 1,5 h (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*) bzw. 2 h (*Shigella flexneri*) weiterinkubiert, um die extrazellulär vorhandenen Bakterien abzutöten.

Zelllyse

Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen. Für die Zelllyse wurde eiskaltes 0,2% Triton-X100 (in H₂O) verwendet (500 µl pro Loch). Sie erfolgte für 20 min bei RT. Danach wurde eine Verdünnungsreihe in dreifacher Ausführung mit MilliQ-H₂O angesetzt.

Ausplattieren der Zelllysate

Abschließend wurde jede Zelllysate-Verdünnung dreifach auf den entsprechenden Bakterienkulturmedium-Agarplatten mit Hilfe eines Spiralplattiergerätes (Autoplate 4000, Spiral Biotech; BIO-SYS) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Auszählung der Bakterienkolonien („Output“) und die Auswertung des Versuches erfolgten am nächsten Tag.

Herstellung von Zellextrakten und Ausplattieren der eingesetzten Bakterien

Außerdem wurden zum Abgleich des eingesetzten Zellmaterials Zellextrakte der infizierten Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen nach der Postinfektion dreimal mit PBS gewaschen und in 4x Probenpuffer (20 µl pro Loch) aufgenommen.

Zusätzlich wurde aus dem 1 ml der eingesetzten Bakterien (s. Infektion) eine Verdünnungsreihe mit H₂O angesetzt, welche ebenfalls dreifach auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert wurde. Dies diente der Kalkulation des „Input“.

Die entstandenen Bakterienkolonien („Output“ und „Input“) wurden mit Hilfe eines Kolonienzählers (Omnilab) gezählt und gemäß der Angaben des Spiralplattiergeräteherstellers in KBE/ml (**K**olonien**b**ildende **E**inheiten/ml) umgerechnet.

Abschließend wurde der „Output“ durch den „Input“ dividiert, um den eigentlichen Faktor der Aufnahme zu errechnen.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden normalisiert (Invasionseffizienz von Wildtyp-Bakterien in Kontrollzellen = 1) und als „Invasionsrate“ angegeben.

Die Resultate wurden schlussendlich aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils dreifacher Ausfertigung errechnet.

2.7.8 Infektion eukaryotischer Zellen mit *Listeria monocytogenes*

5 ml BHI-Medium wurden mit einer Kolonie *Listeria monocytogenes* von einer BHI-Agarplatte angeimpft und ü.N. bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurde 1 ml abgenommen, zentrifugiert (3000 rpm, 3 min) und einmal mit PBS gewaschen. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml Infektionsmedium (Wachstumsmedium ohne FCS, ohne P/S) resuspendiert und 1:100 in frischem Infektionsmedium verdünnt auf die Zellen gegeben. Die Listerien wurden auf die Zellen zentrifugiert (1900 rpm, 4 min), um die Infektion zu starten und zu synchronisieren. Die Infektion wurde

bei 37°C und 7,5% CO₂ für 20-80 min durchgeführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 4% PFA (in PBS) für 20 min bei RT fixiert und abschließend dreimal mit PBS gewaschen.

2.7.9 Infektion eukaryotischer Zellen mit *Salmonella typhimurium*

Die Infektion von eukaryotischen Zellen mit *Salmonella typhimurium* wurde ähnlich der mit *Listeria monocytogenes* (s. Kapitel 2.7.7) durchgeführt. *Salmonella typhimurium* wurde in LB-Medium kultiviert. Die ü.N.-Kultur wurde 1:33 in frischem LB-Medium verdünnt und für weitere 3 h inkubiert. Die Infektionszeit betrug 10-20 min.

Einige der Ansätze wurden für Elektronenmikroskopie verwendet. Dazu wurden die Zellen nach der Infektion einmal mit Cacodylat-Puffer gewaschen, durch Zugabe von Fixans fixiert und von Dr. Manfred Rohde (GBF) elektronenmikroskopisch analysiert.

<i>Fixans</i> (pH 6,9) :	100	mM	Cacodylat
	900	mM	Saccharose
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	CaCl ₂
	2	%	Glutaraldehyd
	5	%	Formaldehyd

2.8 Digitale Fluoreszenzmikroskopie

Die gesamte Fluoreszenzmikroskopie des zellulären Zytoskeletts wurde im Prinzip wie in (Herzog et al., 1994) und (Mies et al., 1998) beschrieben, durchgeführt.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) an Proteine gekoppelt. Durch Anregung dieser Farbstoffe mit einer definierten Wellenlänge emittieren sie Licht mit einer längeren Wellenlänge. Dadurch ist möglich, die räumliche sowie zeitliche Lokalisation der markierten Zellbestandteile in einer lebenden oder fixierten Zelle zu beobachten.

Das optische System eines Fluoreszenzmikroskops weist im Gegensatz zu einem normalen Mikroskop einige Besonderheiten auf. Es besteht aus zwei Sperrfiltern und einem dichroitischen Spiegel. Eine Quecksilberhochdruckdampflampe strahlt Licht auf den ersten Sperrfilter. Dieser ermöglicht nur den Durchtritt von Licht einer bestimmten Wellenlänge, mit der die Fluorochrome angeregt werden sollen. Das Licht passiert den dichroitischen Spiegel und trifft anschließend auf den zweiten Sperrfilter, der gestreutes Anregungslicht entfernt und

das von den Fluorochromen emittierte Licht auf einen definierten Wellenlängenbereich begrenzt. Das emittierte Licht wird danach entweder zum Okular oder zu einem mit einer CCD-Kamera bestückten Mikroskopausgang weitergeleitet. Die von der Kamera aufgenommenen Lichtinformationen werden durch einen A/D-Wandler in digitale Graustufenwerte umgesetzt und dann an einem Computer mit geeigneter Bildbearbeitungssoftware weiter verarbeitet.

Mikroskop

Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135TV (Carl Zeiss) mit wahlweise regelbarer Quecksilberdampf Lampe (AttoArc System, Carl Zeiss; HBO 100W/2, Osram) oder Wolframlampe (HLX64625, FCR 12V, 100W, Osram) und manuell oder mittels Software kontrollierbarem Filterrad; durch Optovar-Linsen lässt sich die Gesamtvergrößerung um das 1,6- bzw. 2,5-fache erhöhen.

Objektive

40x, 63x und 100x 1,3 NA Plan-Neofluar-Immersionsölobjektive (Carl Zeiss):

Das verwendete Immersionsöl (Carl Zeiss) hatte einen Brechungsindex von 1,518.

Beleuchtung

Regelung der Beleuchtung durch elektronisch aktivierbare Schnellverschlüsse (UniBlitz Modul D 122 Shutter-Driver, Visitron Systems); manuell oder Software-gesteuerte Shutter

CCD-Kamerasystem

Auf -25°C gekühlte Charged-Coupled-Device Kamera (TE/CCD-1000 TKB, Princeton Instruments Inc.) mit elektronisch aktivierter Kontrolleinheit und Verschluss

Observationskammer

Zur Beobachtung lebender Zellen wurde eine beheizbare Observationskammer mit dazugehöriger Kontrolleinheit (TC-324B, Warner Instrument Corp.) verwendet.

Aufnahmekontrolle und Bildverarbeitung

Aufnahmekontrolle, Kontrolle der Schnellverschlüsse, Kamerasteuerung und Bildverarbeitung erfolgten mit der IPLab Spectrum Scientific Imaging Software (Scanalytics) an einem Apple Macintosh 9600/350. Die weitere Bildverarbeitung für die Präsentation erfolgte mit Adobe Photoshop 5.0 / CS an einem Apple Macintosh G4. Statistische Analysen wurden mit Microsoft Excel 2000 sowie Sigma Plot 8.0 durchgeführt.

2.8.1 Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen

Für die Mikroskopie lebender Zellen wurde eine beheizbare Kammer (Warner Instrument Corp.) verwendet. Das Deckgläschen (15 mm) wurde in die Kammer eingespannt, welche sogleich vorsichtig mit Observationsmedium (s. Kapitel 2.3.1) luftblasenfrei gefüllt und auf 37°C beheizt wurde. Nach Adaptation der Zellen an das veränderte Milieu konnte mit der Aufnahme von Einzelbildern und Sequenzen begonnen werden.

Für die Aufnahme von Einzelbildern mussten folgende Parameter festgelegt werden:

Auswahl des Shutter für Fluoreszenz- oder Phasenkontrast-Beleuchtung, Belichtungsstärke und –zeit sowie die Bildgröße.

Für die Aufnahme von Sequenzen mussten zusätzliche Parameter festgelegt werden:

Anzahl der Einzelbilder, Möglichkeit der Kombination von Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Aufnahmen sowie die Zeit zwischen den einzelnen Aufnahmen.

Aluminium-Fluorid-Behandlung von B16-F1-Zellen

Werden B16-F1-Zellen mit Aluminiumfluorid behandelt, so bilden sie breite, ebenmäßige Lamellipodien aus (Hahne et al. 2001). Anhand dessen lässt sich eine mögliche Lokalisation diverser Proteine insbesondere an der lamellipodialen Spitze einfacher beobachten.

Das Observationsmedium wurde mit 50 μM AlCl_3 / 30 mM NaF versetzt und auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurde mit der Aufnahme von Sequenzen und Einzelbildern begonnen.

2.8.2 Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen

Bei der indirekten Immunfluoreszenz fixierter Zellen erfolgt die Visualisierung der Proteine durch die Bindung eines primären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den Primärantikörper wird eine hohe Sensitivität erreicht.

Bei der Durchführung ist darauf zu achten, dass alle verwendeten Lösungen auf RT vorgewärmt sind.

Fixierung und Extraktion

Die Zellen wurden zunächst für 20 min bei RT mit auf 37°C vorgewärmtem 4% Paraformaldehyd (PFA; in PBS) fixiert. PFA vernetzt Proteinkomponenten untereinander. Dann wurden die Zellen mit einem Detergenz permeabilisiert (0,1% Triton-X100 in PBS, 45 s bei RT), damit die Antikörper in die Zellen und die entsprechenden Kompartimente gelangen

konnten. Überschüssiges PFA bzw. Detergenz wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt.

Antikörperhybridisierung

Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden für 20-30 min mit einer Blocking-Lösung (5% Pferdeserum in 1% BSA in PBS) inkubiert. Auf ein Stück Parafilm wurden 20 µl des primären Antikörpers pipettiert (Hybridomaüberstände unverdünnt, aufgereinigte Antikörper mit 10 µg/ml in 1% BSA in PBS). Das Deckgläschen wurde mit der Zellseite nach unten auf den Antikörpertropfen gelegt und für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde ebenso durchgeführt. Dem Sekundärantikörper wurde gegebenenfalls Phalloidin (s.u.) für die Färbung von Aktinfilamenten beigemischt.

Abschließend wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen Mowiol (mit 2,5 µg/ml n-Propylgalat als Ausbleichschutz) auf einen Objektträger gelegt, getrocknet und bis zur Auswertung mittels Mikroskopie bei 4°C gelagert.

Die in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.4 und 2.5 aufgelistet.

Phalloidin

Phalloidin, ein Gift des weissen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, lagert sich seitlich an Aktinfilamente an und blockiert dadurch die Depolymerisation (Cooper, 1987). Durch Fluorochrome, die an Phalloidin gekoppelt werden, können Aktinfilamente für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

- Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor™ 350 (Molecular Probes) : 1:200
- Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor™ 488 (Molecular Probes) : 1:200
- Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor™ 594 (Molecular Probes) : 1:400

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung und Charakterisierung von GFP-Konstrukten und Antikörpern

Die Herstellung von spezialisierten „Werkzeugen“ in Form von Expressionskonstrukten und Antikörpern ist erforderlich, um eine genaue Untersuchung der prominentesten Signalwege zur Aktinreorganisation, die durch die kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac vermittelt wird, vornehmen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden GFP-fusionierte Konstrukte der Mitglieder der WAVE- sowie der IRSp53-Proteinfamilie und polyklonale Antikörper gegen diese hergestellt. Für die Analyse von z.B. N-WASP, dem Arp2/3-Komplex und den Rho-GTPasen wurden bereits vorhandene bzw. kommerziell erhältliche Reagenzien verwendet (s. auch Kapitel 2).

3.1.1 Klonierung der cDNAs von murinem WAVE1, -2 und -3, von murinem IRTKS und humanem FLJ22582

Um die subzelluläre Lokalisation der drei WAVE-Isoformen und der beiden IRSp53-Familienmitglieder IRTKS und FLJ22582 untersuchen sowie die betreffenden Antikörper charakterisieren zu können, wurden die entsprechenden cDNAs dieser Proteine in pEGFP-Vektoren kloniert (s. Kapitel 2.4).

Für die Klonierung von WAVE1, WAVE3, IRTKS sowie FLJ22582 wurden EST-Klone verwendet (s. Kapitel 2.4.4; RZPD, Berlin). Die EST-Klone von sowohl WAVE1 und 3 als auch IRTKS lagen in dem eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-Sport6 vor, während FLJ22582 in dem Klonierungsvektor pOTB7 vorlag.

Zunächst wurden die EST-Klone sequenziert, um die Korrektheit und Richtung der enthaltenen Sequenz zu bestimmen. Dann wurden die cDNAs mit Hilfe spezifischer Primer (s. Tab. 2.3) in pEGFP-Vektoren umklontiert und mittels Sequenzierung deren Leserahmen überprüft.

Als Vorlage für die murinen WAVE2-Konstrukte wurde cDNA der Zelllinie B16-F1 verwendet.

Die videomikroskopische Validierung der Konstrukte ist in Kapitel 3.1.3 bzw. 3.1.5 beschrieben.

3.1.2 Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen WAVE1, -2 und -3

Die Herstellung der polyklonalen Antikörper erfolgte wie in Kapitel 2.6.5 – 2.6.6 beschrieben. Neben den hier hergestellten Antikörpern wurden von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellte Antikörper verwendet.

Die Spezifität der Antikörper wurde zunächst mittels Western Blot Analysen von diversen Zellextrakten sowie von Extrakten mit überexprimiertem GFP-Fusionsprotein (s. Kapitel 2.6.3 - 2.6.4) bestimmt. Des Weiteren wurden die Antikörper zum Teil in der indirekten Immunfluoreszenz (s. Kapitel 2.8.2) sowie der Immunpräzipitation (s. Kapitel 2.6.7) eingesetzt.

Abbildung 3.1 zeigt das anti-PAN-WAVE-Antiserum (Innocenti et al., 2004). In Zellextrakten der Zelllinien VA-13 und B16-F1 erkennt es endogenes Protein (ca. 85 kDa). Da das Antiserum aber alle drei WAVE-Isoformen als GFP-Fusionsprotein erkennt, ließ sich hier nicht eindeutig bestimmen, welche endogene WAVE-Isoform in den Zellen exprimiert wird.

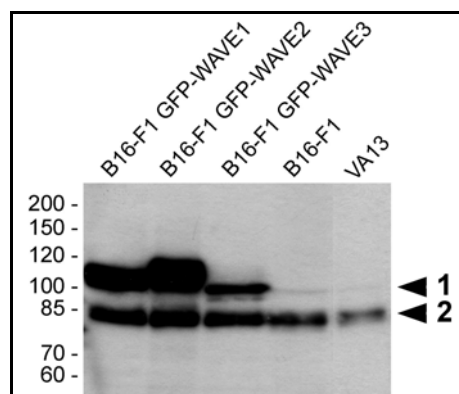


Abbildung 3.1: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE2 Antiserums.

Das polyklonale anti-PAN-WAVE Antiserum (Innocenti et al., 2004) erkennt alle drei WAVE-Isoformen (Pfeilspitze 1), welche hier als GFP-Fusionskonstrukte in B16-F1 Zellen exprimiert wurden sowie endogenes WAVE (Pfeilspitze 2).

Der in dieser Arbeit hergestellte polyklonale anti-WAVE2 Antikörper 5502 detektiert sowohl in B16-F1 und VA-13 Zellextrakten als auch in Maushirnextrakt endogenes Protein (s. Abb. 3.2; Pfeil 2). Da er aber alle drei WAVE-Isoformen als GFP-Fusionsprotein (s. Abb. 3.2; Pfeil 1) erkennt, lässt sich auch hier nicht bestimmen, welche WAVE-Isoform in den getesteten Zellen exprimiert wird.

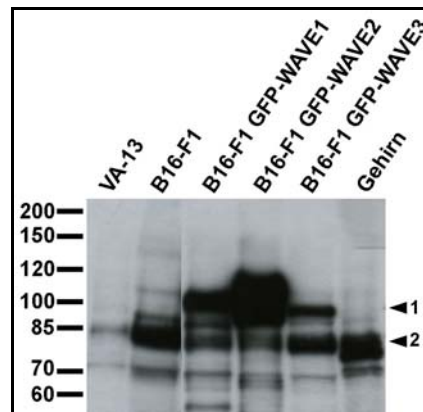


Abbildung 3.2: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE2 Antikörpers 5502.

Der polyklonale Antikörper 5502 gegen WAVE2 erkennt alle drei WAVE-Isoformen (Pfeilspitze 1), welche hier als GFP-Fusionskonstrukte in B16-F1 Zellen exprimiert wurden (Spur 1-3) sowie endogenes WAVE (Pfeilspitze 2) in sowohl VA-13 und B16-F1 Zellen als auch Maushirn.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Antikörpern ist der gegen WAVE1 gerichtete polyklonale Antikörper 5065 spezifisch. Er detektiert überexprimiertes GFP-WAVE1 sowie endogenes Protein in Maushirn (s. Abb. 3.3), aber nicht GFP-fusioniertes WAVE2 oder WAVE3.

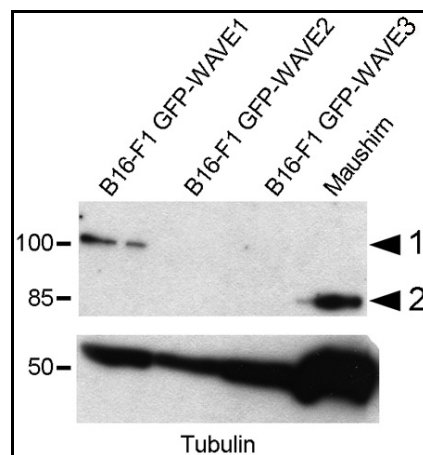


Abbildung 3.3: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE1 Antikörpers 5065.

(1) Der polyklonale Antikörper 5065 gegen WAVE1 erkennt spezifisch WAVE1, welches hier als GFP-Fusionskonstrukt in B16-F1 Zellen exprimiert wurde (Pfeilspitze 1) sowie endogenes WAVE1 (Pfeilspitze 2) in Maushirn. Als Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin Antikörper verwendet.

Um herauszufinden, welche WAVE-Isoformen in den Zelllinien VA-13 und B16-F1 exprimiert werden, wurden entsprechende Zellextrakte mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des anti-WAVE1 Antikörpers 5065 überprüft. Als Positivkontrolle diente das überexprimierte GFP-Fusionsprotein sowie Maushirnextrakt. Aus Abbildung 3.4 geht hervor, dass WAVE1 weder in VA-13 noch in B16-F1 Zellen auf detektierbarem Proteinlevel exprimiert wird.

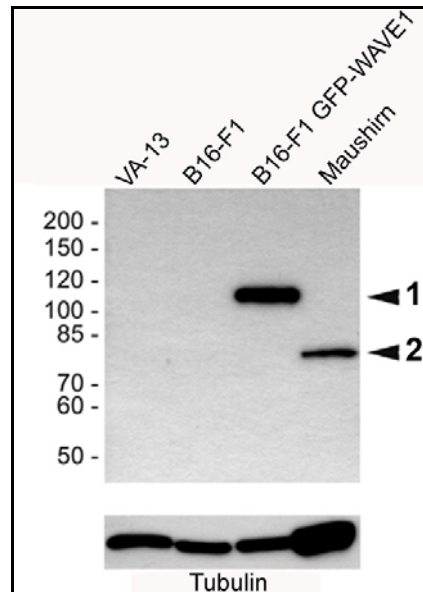


Abbildung 3.4: VA-13 und B16-F1 Zellen exprimieren kein WAVE1.

Der polyklonale Antikörper 5065 gegen WAVE1 erkennt in Mäusehirn endogenes WAVE1 (2) sowie das GFP-WAVE1-Konstrukt in B16-F1 Zellen (1). In den untransfizierten Zelllinien VA-13 und B16-F1 wurde kein endogenes WAVE1 detektiert. Als Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin Antikörper verwendet.

Bei der Charakterisierung des polyklonalen anti-WAVE3 Antikörpers 5062 zeigte sich ebenfalls, dass er spezifisch ist. Abbildung 3.5 verdeutlicht, dass der Antikörper neben dem GFP-WAVE3-Fusionsprotein auch eine endogene Proteinbande in Maushirnextrakt detektiert.

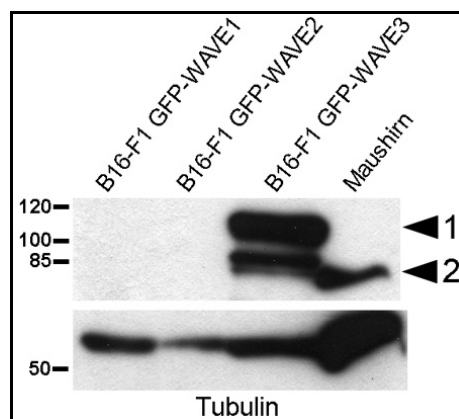


Abbildung 3.5: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-WAVE3 Antikörpers 5062.

Der polyklonale Antikörper 5062 gegen WAVE3 erkennt in Mäusehirn endogenes WAVE3 (2) sowie das GFP-Konstrukt (1). Als Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin Antikörper verwendet. Die mit Sternchen versehene Bande ist ein Abbauprodukt des GFP-WAVE3.

Des Weiteren wurde mittels Western Blot Analyse ermittelt, ob die Zelllinien VA-13 und B16-F1 die WAVE3-Isoform exprimieren. Abbildung 3.6 zeigt, dass dies nicht der Fall ist.

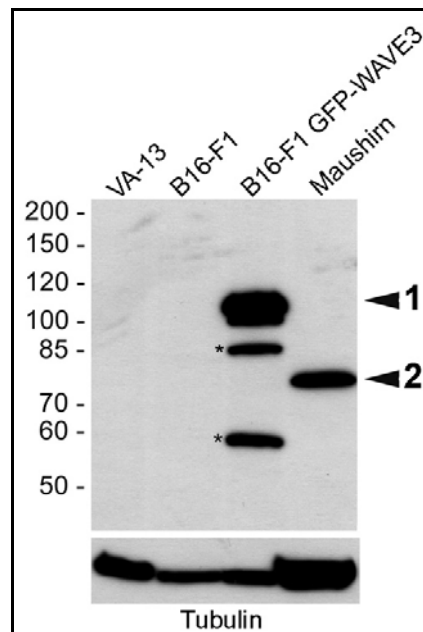


Abbildung 3.6: VA-13 und B16-F1 Zellen exprimieren kein WAVE3.

Der polyklonale Antikörper 5062 gegen WAVE3 erkennt in Mäusehirn endogenes WAVE3 (2) sowie das GFP-Konstrukt (1). Die mit Sternchen versehenen Banden sind Abbauprodukte des GFP-WAVE3. Als Ladekontrolle wurde ein anti-Tubulin Antikörper verwendet.

Aus der Charakterisierung der polyklonalen anti-WAVE Antikörper geht hervor, dass die Zelllinien VA-13 und B16-F1 weder WAVE1 noch WAVE3 auf detektierbarem Proteinlevel exprimieren. Da das anti-PAN-WAVE Antiserum sowie der anti-WAVE Antikörper 5502 eine endogene Proteinbande in den genannten Zelllinien detektieren, muss es sich dabei folglich um WAVE2 handeln.

3.1.3 WAVE1, -2 und -3 lokalisieren an der lamellipodialen Spitze von Aluminiumfluorid-behandelten B16-F1 Zellen

Die WASP/Scar-Protein-Familie wurde bereits in Kapitel 1.5 detailliert beschrieben.

Es wurde gezeigt, dass das humane Scar-Homolog WAVE1 mit dem Arp2/3-Komplex interagiert (Machesky et al., 1998) und ‚downstream‘ von Rac Aktinreorganisation induziert (Miki et al., 1998b). Des Weiteren wurde beobachtet, dass humanes WAVE1 an der Spitze von Lamellipodien lokalisiert (Hahne et al., 2001).

Um die Funktionalität der in dieser Arbeit hergestellten WAVE-Konstrukte zu überprüfen und die Lokalisation zu bestätigen, wurden Videomikroskopie (s. Kapitel 2.8.1) und indirekte Immunfluoreszenz (s. Kapitel 2.8.2) verwendet.

B16-F1 Zellen wurden auf Laminin-beschichteten Deckgläschen ausgesät, mit Aluminiumfluorid stimuliert und für die indirekte Immunfluoreszenz mit anti-PAN-WAVE Antiserum (Innocenti et al., 2004) gefärbt. Das Aktinzytoskelett wurde mittels Phalloidin-färbung visualisiert. Es konnte bestätigt werden, dass endogenes WAVE2 an der Spitze von Lamellipodien lokalisiert (s. Abb. 3.7).

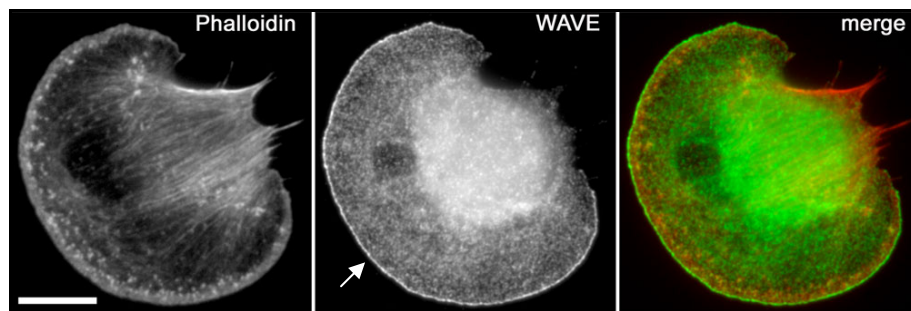


Abbildung 3.7: Lokalisation von WAVE2 in B16-F1 Zellen auf Laminin.

Mit Aluminiumfluorid stimulierte B16-F1 Zellen zeigen eine Lokalisation von WAVE2 an der lamellipodialen Spitze (Pfeil). Im linken Bild ist das mit Phalloidin gefärbte Aktin dargestellt, in der Mitte die WAVE-Färbung (Pfeil). Ganz rechts sind die übereinander gelegten Bilder gezeigt (Phalloidin: rot, WAVE2: grün). Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

Die ektopische Expression der GFP-WAVE-Konstrukte in B16-F1 Zellen bestätigte diese Lokalisation. Hierfür wurden transfizierte, mit Aluminiumfluorid stimulierte B16-F1 Zellen mittels Videomikroskopie analysiert (s. Kapitel 2.8.1). Abbildung 3.8 zeigt eine mit WAVE1-GFP bzw. mit GFP-WAVE3 transfizierte Zelle. Die Lokalisation der Proteine an der lamellipodialen Spitze ist eindeutig erkennbar (s. Pfeilspitze). Auch GFP-mRFP-WAVE2 lokalisiert an der vordersten Zellfront (nicht gezeigt).

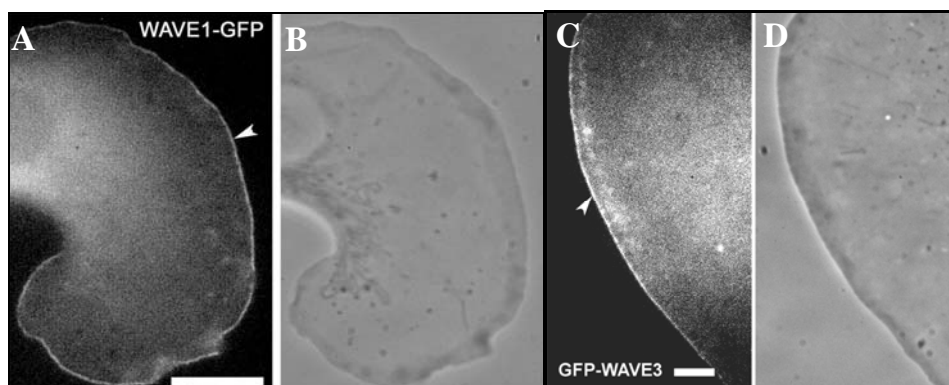


Abbildung 3.8: Lokalisation von WAVE1-GFP und GFP-WAVE3 in B16-F1 Zellen auf Laminin.

Transfizierte B16-F1 Zellen auf Laminin zeigen eine Lokalisation von WAVE1-GFP (A) bzw. GFP-WAVE3 (C) an der Spitze von Lamellipodien (Pfeilspitze). Das jeweils rechte Bild (B, D) zeigt die entsprechende Phasenkontrastaufnahme der selben Zelle. Der Balken entspricht jeweils einer Größe von 10 µm.

3.1.4 Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen IRSp53, IRTKS und FLJ22582

Die Herstellung und Reinigung der polyklonalen Antiseren erfolgte wie in Kapitel 2.6.5 – 2.6.6 beschrieben. Die erhaltenen Antikörper wurden mittels Western Blot Analysen auf ihre Spezifität überprüft.

Abbildung 3.9 zeigt den von Prof. Tadaomi Takenawa (Universität Tokio, Japan) zur Verfügung gestellten polyklonalen anti-IRSp53 Antikörper. Er erkennt spezifisch das überexprimierte GFP-Fusionskonstrukt (Pfeilspitze 1 in Abb. 3.9). IRSp53 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 58 kDa, auf dieser Höhe erkennt der Antikörper ebenfalls eine Bande (Pfeilspitze 2 in Abb. 3.9). Da der Antikörper aber mehrere Kreuzreaktionen (z.B. auf Höhe von 65 kDa) aufweist, ist eine eindeutige Aussage über das apparente Molekulargewicht des endogenen Proteins in diesen Zellen nur schwer zu treffen.

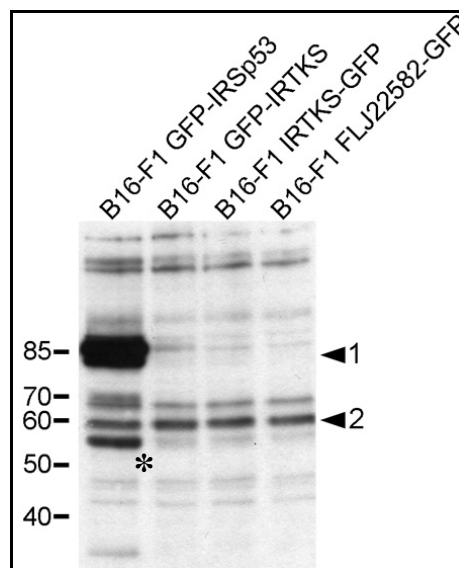


Abbildung 3.9: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-IRSp53 Antikörpers (z. Vfg. g. von Tadaomi Takenawa, Japan). Der polyklonale anti-IRSp53 Antikörper erkennt IRSp53, welches hier als GFP-Fusionskonstrukt in B16-F1 Zellen exprimiert wurde (Pfeilspitze 1). Das theoretische Molekulargewicht von IRSp53 beträgt 58 kDa, auf dieser Höhe detektiert der verwendete Antikörper ebenfalls eine Bande (Pfeilspitze 2). (* Abbauprodukt des GFP-Konstrukts)

Zum Vergleich wurde ein zweiter polyklonaler anti-IRSp53 Antikörper (5058) herangezogen. Auch er erkennt spezifisch das GFP-Fusionsprotein (s. Abbildung 3.10; Pfeilspitze 1). Auf Höhe des theoretischen Molekulargewichts von endogenem IRSp53 (58 kDa) detektiert der Antikörper 5058 allerdings keine deutliche Bande. Zudem zeigt dieser Antikörper ebenfalls viele Kreuzreaktionen. Die in dieser Arbeit hergestellten anti-IRSp53 Antikörper eignen sich

also nicht, um das endogene Protein zu analysieren. Für Untersuchungen des rekombinanten, GFP-fusionierten IRSp53 können aber beide Antikörper verwendet werden.

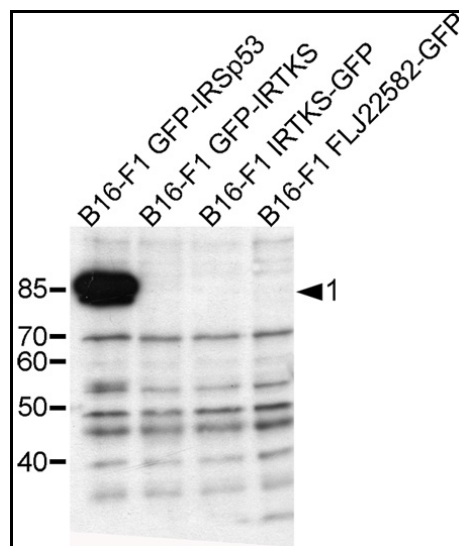


Abbildung 3.10: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-IRSp53 Antikörpers 5058.

Der polyklonale anti-IRSp53 Antikörper 5058 erkennt IRSp53, welches hier als GFP-Fusionskonstrukt in B16-F1 Zellen exprimiert wurde (Pfeilspitze 1). Auf Höhe des theoretischen Molekulargewichts von IRSp53 (58 kDa) detektiert der Antikörper aber keine deutliche Bande.

Um die Expression des GFP-Fusionsproteins von IRTKS zu überprüfen und die Antikörper-Spezifität zu ermitteln, wurde der polyklonale anti-IRTKS Antikörper 5498 2B ebenfalls auf verschiedenen B16-F1 Zellextrakten getestet. Abbildung 3.11 zeigt, dass der Antikörper das überexprimierte GFP-Fusionsprotein (Pfeil 1, ca. 85 kDa) erkennt, nicht aber GFP-IRSp53 oder FLJ22582-GFP. Des Weiteren wird ein unscharfes Signal auf Höhe von etwa 58-62 kDa detektiert, was annähernd mit dem theoretischen Molekulargewicht des endogenen IRTKS (58 kDa) übereinstimmt (Pfeil 2). In den B16-F1 Extrakten mit GFP-fusioniertem IRTKS werden zusätzliche Banden detektiert (Sternchen). Dabei handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte des mit GFP fusionierten IRTKS.

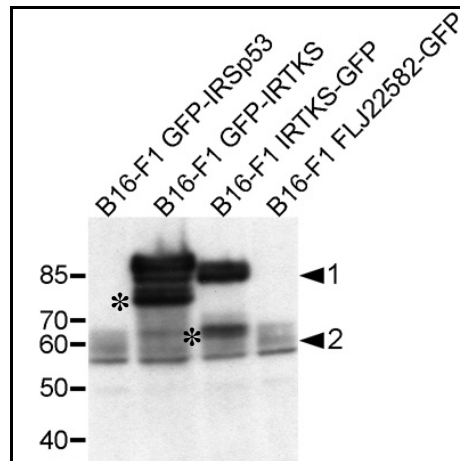


Abbildung 3.11: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-IRTKS Antikörpers 5498 2B.

Der polyklonale anti-IRTKS Antikörper 5498 2B erkennt spezifisch IRTKS, welches hier als GFP-Fusionskonstrukt in B16-F1 Zellen exprimiert wurde (Pfeilspitze 1). Das theoretische Molekulargewicht von IRTKS beträgt 58 kDa, auf dieser Höhe detektiert der verwendete Antikörper ebenfalls ein Signal (Pfeilspitze 2). (*: Abbaubande des mit GFP fusionierten IRTKS)

Auch der polyklonale anti-FLJ22582 Antikörper 7170 wurde mittels Western Blotting auf seine Spezifität getestet. Aus Abbildung 3.12 geht hervor, dass dieser Antikörper spezifisch das GFP-Fusionsprotein erkennt (Pfeilspitze 1; Abb. 3.12), aber nicht GFP-fusioniertes IRSp53 oder IRTKS. Auch in Extrakten von VA-13 Zellen und Maushirn wird eine Bande auf Höhe von ca. 85 kDa detektiert. In diesen Extrakten ist aber kein GFP-getaggtetes FLJ22582 vorhanden. Außerdem wird in keinem der verwendeten Extrakte aus murinen B16-F1 Zellen eine Bande auf dieser Höhe detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass die in VA-13 Zellen und Maushirn detektierte Bande auf Höhe von 85 kDa eine Kreuzreaktion ist (Abb. 3.12, K).

Das theoretische Molekulargewicht von endogenem FLJ22582 beträgt 59 kDa, auf dieser Höhe detektiert der Antikörper 7170 lediglich in Maushirnextrakt eine Bande (Pfeilspitze 2; Abb. 3.12). Die Bande, die auf derselben Höhe in B16-F1 FLJ22582-Extrakt erkannt wird (Sternchen), ist vermutlich ein Abbauprodukt des GFP-Fusionsproteins, da in keinem der anderen verwendeten B16-F1 Extrakte ein derartiges Signal detektiert wird.

Laut EST-Datenbanken wird FLJ22582 spezifisch in neuronalem Gewebe exprimiert, also ist es nicht verwunderlich, dass der Antikörper 7170 in den verwendeten fibroblastoiden Zelllinien kein endogenes Protein detektiert. Die Analyse von neuronalen Zellen (wie z.B. differenzierten PC12 Zellen) und anderen fibroblastoiden Zellen als den hier verwendeten bzw. diversen Gewebeextrakten könnte das Expressionsmuster von FLJ22582 aufklären.

Der Antikörper 7170 ist für die Analyse von rekombinantem, GFP-fusioniertem FLJ22582 geeignet.

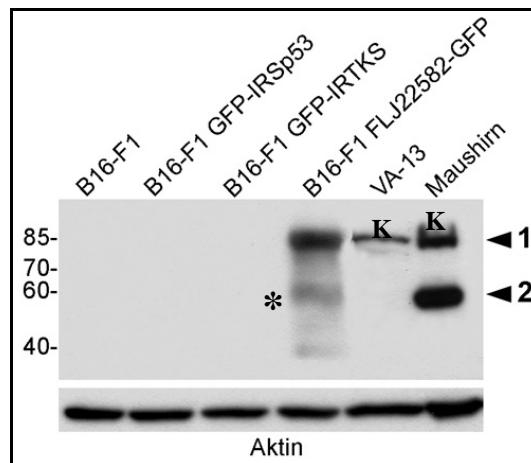


Abbildung 3.12: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-FLJ22582 Antikörpers 7170.

Der polyklonale anti-FLJ22582 Antikörper 7170 erkennt spezifisch FLJ22582, welches hier als GFP-Fusionskonstrukt in B16-F1 Zellen exprimiert wurde (Pfeilspitze 1). Das theoretische Molekulargewicht von FLJ22582 beträgt 59 kDa, auf dieser Höhe detektiert der verwendete Antikörper lediglich ein Signal in Maushirnextrakt (Pfeilspitze 2). Als Ladekontrolle wurde ein anti-Aktin Antikörper verwendet. (*: Abbaubande des FLJ22582-GFP; K: Kreuzreaktion)

3.1.5 IRTKS und FLJ22582 lokalisieren an der lamellipodialen Spitze von Aluminiumfluorid-behandelten B16-F1 Zellen

IRTKS sowie FLJ22582 wurden mittels Sequenzvergleich als IRSp53-verwandte Proteine identifiziert (s. Kapitel 1.6). Von IRSp53 wird vermutet, dass es als Adaptermolekül zwischen der kleinen Rho-GTPase Rac und dem Arp2/3-Komplex-Aktivator WAVE2 fungieren kann (Miki et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass es mit WAVE2 an der Spitze protrusierender Lamellipodien kolokalisiert (Nakagawa et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob IRTKS und FLJ22582 ebenfalls an der lamellipodialen Spitze motiler Zellen lokalisieren, wurden B16-F1 Zellen mit dem jeweiligen GFP-Konstrukt transfiziert, auf Laminin ausgesät und mittels Videomikroskopie beobachtet (s. Kapitel 2.8.1). Die Zellen wurden mit Aluminiumfluorid stimuliert, was die Ausbildung von Lamellipodien zur Folge hat (Hahne et al., 2001).

Sowohl IRTKS als auch FLJ22582 weisen eine eindeutige Lokalisation an der lamellipodialen Spitze auf (s. Abbildung 3.13 und 3.14). Aufgrund dessen übernehmen diese Proteine möglicherweise eine regulatorische Funktion bei der Ausbildung dieser protrusiven Strukturen.

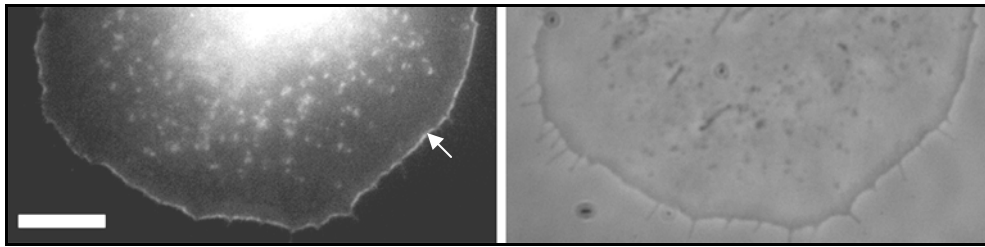


Abbildung 3.13: Lokalisation von IRTKS-GFP in B16-F1 Zellen auf Laminin.

Transfizierte B16-F1 Zellen auf Laminin zeigen eine Lokalisation von IRTKS-GFP an der Spitze von Lamellipodien (Pfeil). Das rechte Bild zeigt die entsprechende Phasenkontrastaufnahme der selben Zelle. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

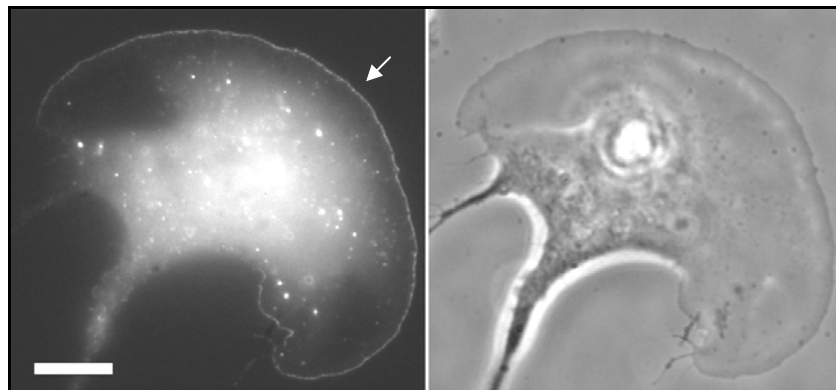


Abbildung 3.14: Lokalisation von FLJ22582-GFP in B16-F1 Zellen auf Laminin.

Transfizierte B16-F1 Zellen auf Laminin zeigen eine Lokalisation von FLJ22582-GFP an der Spitze von Lamellipodien (Pfeil). Das rechte Bild zeigt die entsprechende Phasenkontrastaufnahme der selben Zelle. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

3.1.6 IRSp53 und IRTKS interagieren mit konstitutiv aktivem Rac sowie Cdc42

Wie in Kapitel 1.6 bereits beschrieben, wurde postuliert, dass IRSp53 als Adaptermolekül zwischen Rho-GTPasen (Rac und Cdc42) und deren Effektoren wie z.B. WAVE2 fungiert, da gezeigt wurde, dass es mit diesen Rho-GTPasen und dem Arp2/3-Komplex-Aktivator direkt interagieren kann (Krugmann et al. 2001; Miki et al. 2000; Miki und Takenawa 2002).

Um herauszufinden, ob das IRSp53-verwandte IRTKS ebenfalls an die genannten Rho-GTPasen bindet, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt (s. Kapitel 2.6.7). Hierfür wurden B16-F1 Zellen mit GFP-IRSp53 oder GFP-IRTKS und den konstitutiv-aktiven Varianten myc-L61-Cdc42 oder myc-L61-Rac transfiziert. Für die Immunpräzipitation wurde dann entweder der monoklonale anti-myc Antikörper 9E10 oder der monoklonale anti-GFP Antikörper 270F3 verwendet.

Präzipitiert man die GFP-Fusionsproteine, so werden weder myc-L61-Cdc42 noch myc-L61-Rac kopräzipitiert (s. Abb. 3.15). Möglicherweise stört die Bindung des Antikörpers an den N-terminalen GFP-Tag die Interaktion mit den GTPasen (s.u.).

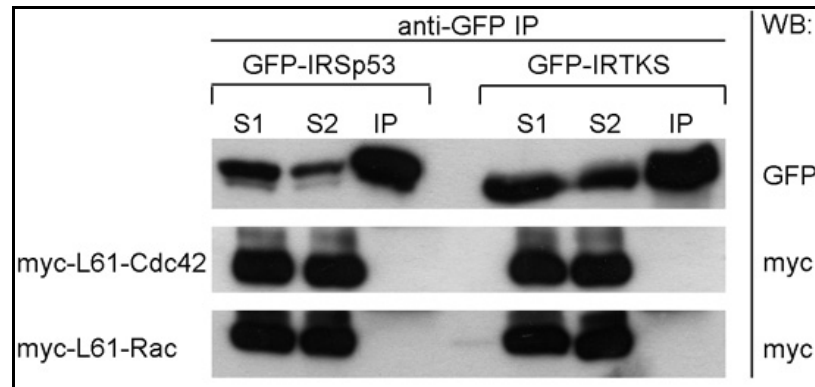


Abbildung 3.15: Die kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac werden nicht mit GFP-IRSp53 und GFP-IRTKS präzipitiert. Immunpräzipitationen (IP) mit dem monoklonalen anti-GFP Antikörper 270F3 aus Lysaten von B16-F1 Zellen, die IRSp53 bzw. IRTKS als GFP-Fusionsprotein sowie die konstitutiv aktiven Rho-GTPasen Rac bzw. Cdc42 als myc-Fusionsprotein exprimieren. Weder myc-L61-Rac noch myc-L61-Cdc42 werden mit GFP-IRSp53 bzw. GFP-IRTKS präzipitiert. Die Western Blots (WB) wurden mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Triton-X100. S1: Zelllysate; S2: Zelllysate nach Inkubation mit dem anti-GFP Antikörper.

Führt man die Immunpräzipitation *vice versa* durch, d.h. präzipitiert man die konstitutiv-aktiven, myc-getaggten Rho-GTPasen, so wird IRTKS sowohl mit Cdc42 als auch mit Rac kopräzipitiert, während IRSp53 vornehmlich mit Rac präzipitiert wird (s. Abb. 3.16, A). Auch Krugmann et al. (2001) zeigten, dass IRSp53 eine Präferenz für die Interaktion mit Cdc42 aber nicht mit Rac hat. Der Aufschluss der Zellen wurde bei den Immunpräzipitationen bei Krugmann et al. sowie bei dem hier beschriebenen Experiment mit Triton-X100 durchgeführt. Falls die Interaktion von IRSp53 mit Rac von Triton-löslichen Komponenten (wie z.B. Phospholipiden) abhängig ist, so stört die Verwendung des Detergenz höchstwahrscheinlich die Interaktion der beiden Proteine. Also wurde die Immunpräzipitation wiederholt, wobei der Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung in Abwesenheit von Detergenzien erfolgte. IRSp53 konnte nun ebenso wie IRTKS sowohl mit Cdc42 als auch Rac kopräzipitiert werden (s. Abb. 3.16, B). Die Bindung an Triton-lösliche Komponenten ist also für eine effiziente Interaktion von IRSp53 mit der aktivierten Rho-GTPase Rac notwendig.

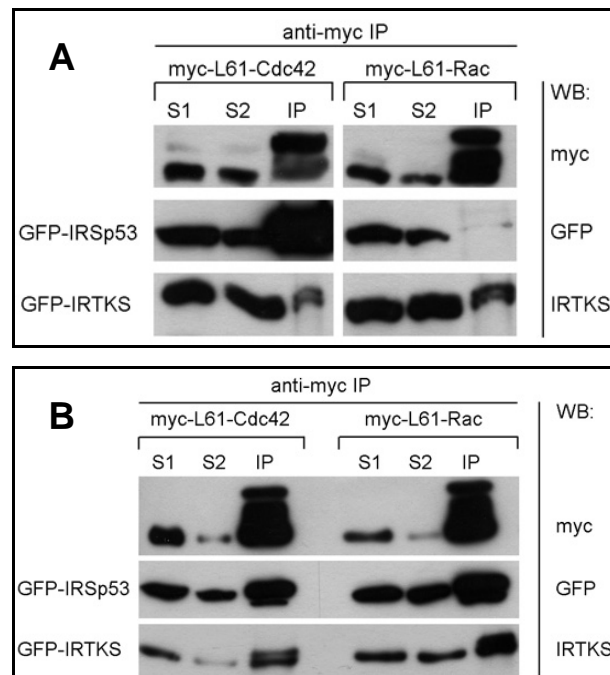


Abbildung 3.16: IRSp53 und IRTKS interagieren mit den kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac. Immunpräzipitationen (IP) mit dem monoklonalen anti-myc Antikörper 9E10 aus Lysaten von B16-F1 Zellen, die IRSp53 bzw. IRTKS als GFP-Fusionsprotein sowie die konstitutiv aktiven Rho-GTPasen Rac bzw. Cdc42 als myc-Fusionsprotein exprimieren. Sowohl IRSp53 als auch IRTKS werden mit myc-L61-Rac sowie myc-L61-Cdc42 präzipitiert, wobei die Interaktion von IRSp53 mit Rac von Triton-löslichen Komponenten abhängig ist. Die Western Blots (WB) wurden mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. (B) Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels (A) Triton-X100 bzw. (B) Ultraschallbehandlung. S1: Zelllysat; S2: Zelllysat nach Inkubation mit dem anti-myc Antikörper.

Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl IRSp53 als auch IRTKS mit den kleinen Rho-GTPasen Rac und Cdc42 interagieren. Ein effizienter Nachweis dieser Interaktion scheint von dem verwendeten ‚Tag‘ und Zellaufschlussprotokoll abzuhängen. So ist die Interaktion von IRSp53 mit aktiviertem Rac abhängig von Triton-löslichen Komponenten. Das IRSp53-verwandte FLJ22582 wurde im Rahmen dieser Studie nicht weiter untersucht, da es in keinem der verwendeten Zelltypen exprimiert wird.

Der Fokus der vorliegenden Doktorarbeit lag auf der Analyse von für die Invasion von bakteriellen Pathogenen relevanten Signalwegen zur Aktinreorganisation der Wirtszelle. Die Rolle von IRSp53 für die Aktinreorganisation ist noch unklar. Außerdem wurde von IRSp53 bereits beschrieben, dass es an der Invasion von *Salmonella typhimurium* in polarisierte Epithelzellen nicht beteiligt ist (Shi et al., 2005). Aus Ermangelung an geeigneten Systemen für entsprechenden Infektionsexperimente (z.B. IRSp53-defiziente Zelllinien) wurde die Analyse von IRSp53 und anverwandten Proteinen hinten angestellt bzw. in andere Projekte der Arbeitsgruppe eingebunden, die sich der hier hergestellten „Werkzeuge“ (Konstrukte und Antikörper) bedienen.

3.2 Die Rolle von Aktinreorganisation induzierenden Signalwegen der Wirtszelle für die Invasion verschiedener bakterieller Pathogene

Die Invasion vieler bakterieller Pathogene geht mit einer signifikanten Reorganisation des Aktinzytoskeletts der Wirtszelle einher. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Pathogene über verschiedene Virulenzfaktoren jene Signalwege der Wirtszelle ansprechen, die grundlegende Funktionen in der Aktinreorganisation haben. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Invasion der bakteriellen Pathogene *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* und *Salmonella typhimurium* –mit besonderem Gewicht auf das Letztere– in Zellen, die Defizienzen in bestimmten Aspekten der Aktinreorganisation aufweisen, analysiert. Dies wird im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Die Rolle der WAVE-Komplex-vermittelten Aktinreorganisation bei der Aufnahme von *Listeria monocytogenes*

Das gram-positive Human- und Tierpathogen *Listeria monocytogenes* vermittelt seine Aufnahme in nicht-phagozytierende Zellen über den sogenannten Zipper-Mechanismus (Isberg und Van Nhieu, 1994). Durch die Interaktion der bakteriellen Oberflächenproteine Internalin A und Internalin B mit den zellulären Transmembranproteinen E-Cadherin bzw. c-Met wird eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts induziert, die darin gipfelt, dass das Bakterium von der Plasmamembran umschlossen und in die Zelle aufgenommen wird (Lecuit et al., 1997; s. auch Kapitel 1.7.1). Mit diesem Prozess wird die Induktion der Phosphatidylinositol 3-Kinase und die darauffolgende Aktivierung der Rho-GTPase Rac in Verbindung gebracht (Kovacs et al., 2002a; Kovacs et al., 2002b; Rottner et al., 2005). Da der WAVE-Komplex die Signalweiterleitung von aktivem Rac zum Arp2/3-Komplex und die Formation von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ vermittelt (Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004), sollte analysiert werden, ob Nap1 und folglich der WAVE-Komplex eine Rolle bei dem von Listerien verwendeten Zipper-Mechanismus spielt. Aus diesem Grund wurden Nap1 RNAi Zellen in Infektionsversuchen untersucht.

Die von Anika Steffen (GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellten Nap1 RNAi Zellen (NS14-4, s. Tabelle 2.1) wurden gemäß Kapitel 2.7.7 mittels Gentamycin Protection Assay hinsichtlich der Aufnahme von *Listeria monocytogenes* untersucht. Als Kontrollzellen wurden Mock RNAi Zellen (VA-13-pSR, s. Tabelle 2.1) verwendet. Als Negativkontrolle der

Listerien wurde eine invasionsdefiziente Deletionsmutante (Δ inlAB, s. Kapitel 2.2.1) eingesetzt.

Es zeigte sich, dass die Aufnahme von *Listeria monocytogenes* in Nap1 RNAi Zellen komplett unterbunden ist (s. Abb. 3.17). Die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte Aktinreorganisation ist also essentiell für die Invasion von *Listeria*.

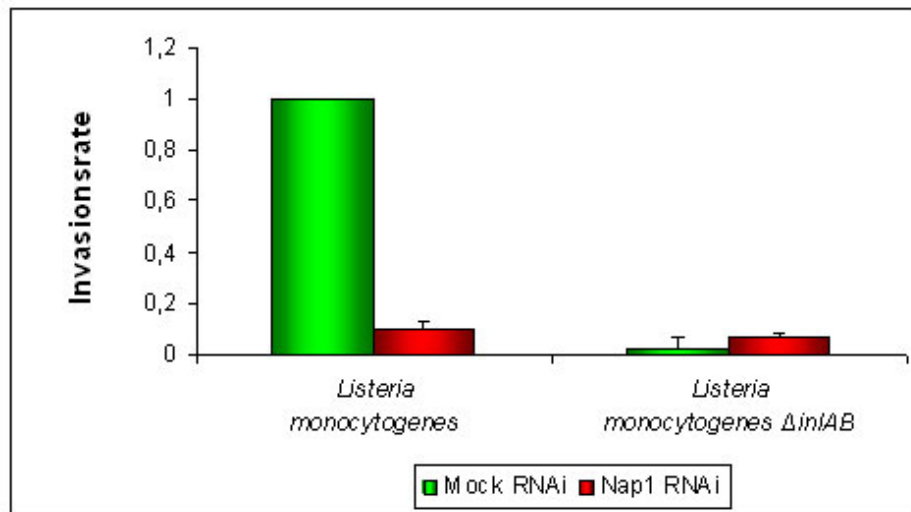


Abbildung 3.17: Die WAVE-Komplex-Komponente Nap1 ist essentiell für die Invasion von *Listeria monocytogenes* in humane VA-13 Zellen. Mit Mock RNAi (grün) und Nap1 RNAi (rot) Zellen wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Listeria monocytogenes* infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Der zelluläre Ligand des bakteriellen Oberflächenproteins Internalin A, E-Cadherin, wird von den hier verwendeten humanen VA-13 Zellen nicht exprimiert (mit Western Blot und Affymetrix-Analysen überprüft, hier nicht gezeigt). Daher beziehen sich die erhaltenen Ergebnisse auf die durch Internalin B vermittelte Invasion von *Listeria monocytogenes*.

3.2.1.1 Kontrolle der Gentamycin Protection Assays

Um sicherzustellen, dass die Aufnahme von *Listeria monocytogenes* und anderer Pathogene (s.u.) in Nap1 RNAi Zellen und anderen defizienten Zellen (s.u.) sich tatsächlich auf vergleichbare Kontrollzell-Anzahlen bezieht, wurden SDS-Extrakte aus dem Gentamycin Protection Assay mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines anti-Aktin oder anti-Tubulin Antikörpers (s. Tabelle 2.4) untersucht. Abbildung 3.18 zeigt einen Beispiel-Blot aus den in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Invasionsexperimenten. Die gleich starken Proteinbanden zeigen an, dass eine vergleichbare Anzahl von Zellen eingesetzt wurde.

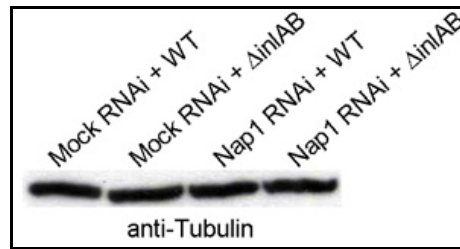


Abbildung 3.18: Western Blot Analyse von Zellextrakten aus dem Gentamycin Protection Assay. Während des Gentamycin Protection Assays wurden wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben SDS-Zellextrakte hergestellt. Diese Extrakte wurden unter Verwendung eines monoklonalen anti-Tubulin Antikörpers mittels Western Blot untersucht. Hier gezeigt sind Extrakte von Mock bzw. Nap1 RNAi Zellen, die im Gentamycin Protection Assay mit *Listeria monocytogenes* WT bzw. Δ inlAB infiziert worden sind. Die gleich starken Proteinbanden zeigen, dass dieselbe Menge an Zellen eingesetzt wurde.

Zum Abgleich der eingesetzten Zellanzahl wurde bei allen durchgeführten Gentamycin Protection Assays ein derartiger Kontroll-Blot durchgeführt. Es flossen nur die Experimente in die Auswertung ein, bei denen eine vergleichbare Menge an Zellen vorhanden war.

Um außerdem die Möglichkeit auszuschließen, dass die Nap1 RNAi Zellen womöglich instabil sind, und während der Kulturdauer Nap1 re-exprimieren, wurden Zellextrakte von sowohl Mock RNAi als auch Nap1 RNAi Zellen regelmäßig mittels Western Blot Analyse auf die Expression von Nap1 getestet.

Abbildung 3.19 zeigt, dass die Nap1 RNAi Zellen faktisch Nap1-defizient sind (Pfeilspitze 1).

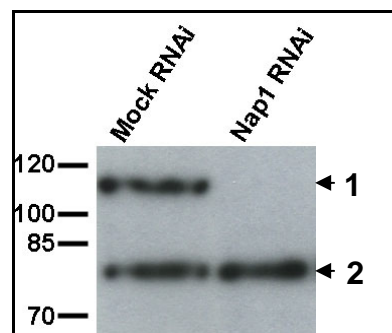


Abbildung 3.19: Western Blot Analyse der Mock und Nap1 RNAi Zellen. Verwendet wurde das monoklonale anti-Nap1 Antiserum 21D12G9 (z.V.g. von Anika Steffen, GBF). Nap1 hat ein Molekulargewicht von ca. 116 kDa (Pfeilspitze 1). Die Kreuzreaktion auf Höhe von ca. 80 kDa wurde als Ladekontrolle verwendet (Pfeilspitze 2).

3.2.2 Die WAVE-Komplex-Komponenten Sra-1 und WAVE2 lokalisieren an der Aufnahmestelle von *Listeria monocytogenes*

Am Beispiel von Nap1 RNAi Zellen, in denen die komplette WAVE-Komplex-Funktion unterbunden ist (s. Kapitel 1.5.3), wurde gezeigt, dass WAVE-Komplex-vermittelte Aktinreorganisation für die Aufnahme von *Listeria monocytogenes* in humane VA-13 Zellen

essentiell ist (s. Kapitel 3.2.1). Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde untersucht, ob die WAVE-Komplex-Komponenten (z.B. Sra-1 und WAVE2) auch tatsächlich an der Eintrittsstelle des Pathogens lokalisieren.

Hierfür wurden NIH3T3 Zellen mit GFP-Sra-1 (z.V.g. von Anika Steffen, GBF, Braunschweig) sowie GFP-WAVE2 transfiziert, mittels FACS gesortet, auf Fibronektin ausgesät und am nächsten Tag 60 min mit *Listeria monocytogenes* infiziert. Für den Nachweis der Listerien mittels Immunfluoreszenz wurde ein polyklonaler anti-Listerien Antikörper (K52; s. Tabelle 2.4) verwendet, während das Aktinzytoskelett der Wirtszelle mittels Phalloidin visualisiert wurde.

Aus Abbildung 3.20 geht hervor, dass sowohl GFP-Sra-1 als auch GFP-WAVE2 an der Aufnahmestelle von *Listeria monocytogenes* lokalisieren, was die essentielle Rolle des WAVE-Komplexes für die Invasion des Pathogenes unterstützt.

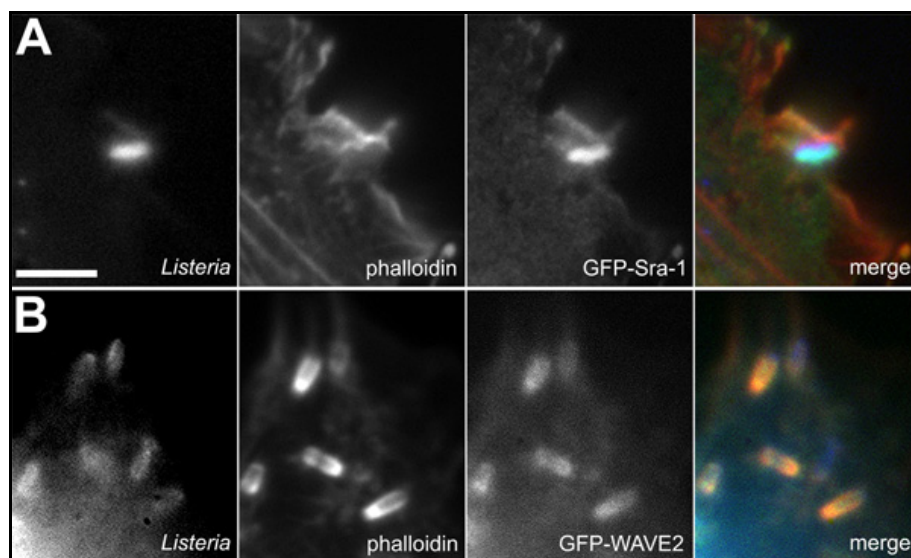


Abbildung 3.20: Lokalisation der WAVE-Komplex-Komponenten WAVE2 und Sra-1 an der Aufnahmestelle von *Listeria monocytogenes*. Mit GFP-Sra-1 (obere Bildreihe) und GFP-WAVE2 (untere Bildreihe) transfizierte NIH3T3 Fibroblasten wurden 60 min mit *Listeria monocytogenes* infiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Links sind die Listerien dargestellt, daneben das Aktinzytoskelett gefolgt von dem jeweiligen GFP-Fusionsprotein. Auf der rechten Seite sind die übereinander gelegten Bilder zu sehen, wobei überlagernde Strukturen gelblich erscheinen (Listerien: blau, Phalloidin: rot, GFP-Fusionsproteine: grün). Der Balken entspricht 5 µm.

3.2.3 Die Bedeutung des WAVE-Komplexes und N-WASP bei der Invasion von *Shigella flexneri*

Das gram-negative Humanpathogen *Shigella flexneri* vermittelt seine Aufnahme in nicht-phagozytische Zellen über den Trigger-Mechanismus (Cossart und Sansonetti, 2004). Diese

Art der bakteriellen Invasion geht mit der Formation von prominenten Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ einher. Daher war die Frage, ob der WAVE-Komplex in diesen Invasionsmechanismus involviert ist, besonders interessant. Über ein Typ III Sekretionssystem injiziert das Bakterium Effektorproteine in die Wirtszelle, was zu Aktinreorganisation und der Ausbildung einer phagozytotischen Tasche führt, über die das Pathogen letztendlich aufgenommen wird (s. auch Kapitel 1.7.2). Insbesondere von den bakteriellen Effektorproteinen IpaC und IpgB1 wird angenommen, dass sie die Rho-GTPase Rac aktivieren können (Nhieu und Sansonetti, 1999; Ohya et al., 2005), wobei sich vor kurzem herausstellte, dass IpgB1 durch molekulares Mimikry die Funktion von aktiviertem Rac direkt nachahmt (Alto et al., 2006). Welche zellulären Proteine ‚downstream‘ von Rac die für die Aufnahme des Bakteriums benötigte Aktinreorganisation induzieren, ist bisher nicht bekannt. Daher wurde eine mögliche Bedeutung des WAVE-Komplexes -über den ‚Knockdown‘ der Komponente Nap1- bei der Invasion von *Shigella flexneri* untersucht. Es wurden Nap1 RNAi Zellen (NS14-4, s. Tabelle 2.1) mittels Gentamycin Protection Assay (s. Kapitel 2.7.7) untersucht. Als Kontrollzellen dienten wiederum Mock RNAi Zellen (VA-13-pSR, s. Tabelle 2.1). Die Negativkontrolle der Shigellen stellte eine invasionsdefiziente Deletionsmutante mit einem Defekt im Typ III Sekretionssystem dar (*Shigella flexneri* Δ mxlD, s. Kapitel 2.2.1). Die Invasionseffizienz der Wildtyp-Bakterien in Nap1 RNAi Zellen lag bei knapp 100 % (s. Abb. 3.21). Somit spielt Nap1 und folglich der WAVE-Komplex überraschenderweise keine signifikante Rolle bei der Invasion von *Shigella flexneri*.

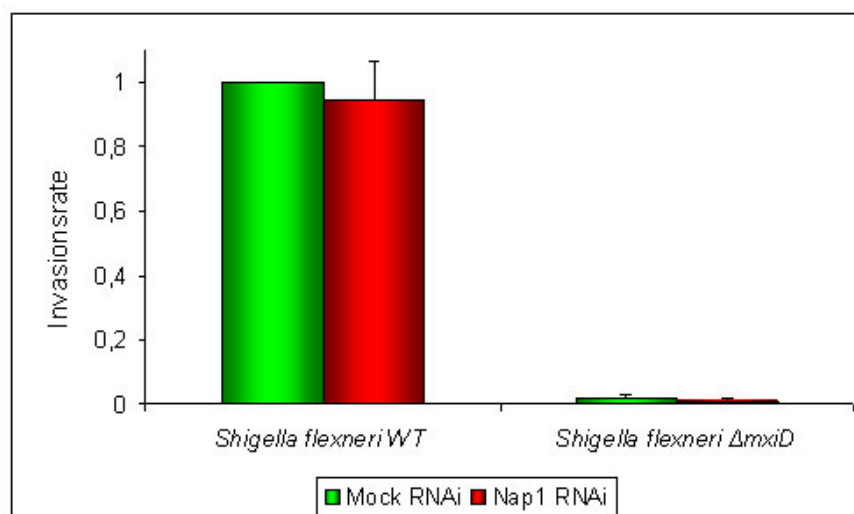


Abbildung 3.21: Nap1 wird für die Invasion von *Shigella flexneri* in humane VA-13 Zellen nicht benötigt. Mock RNAi (grün) oder Nap1 RNAi (rot) Zellen wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Shigella flexneri* infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da Nap1 und folglich die Rac-vermittelte Aktinreorganisation für die Invasion von *Shigella flexneri* nicht benötigt werden, stellte sich die Frage, ob der über N-WASP vermittelte Signalweg eine Rolle spielt. N-WASP wird durch die Interaktion mit Cdc42 und PIP₂ von seiner autoinhibierten in die aktive Konformation überführt und kann darauffolgend die Arp2/3-Komplex-vermittelte *de novo* Aktinnukleation induzieren (Kim et al., 2000; Prehoda et al., 2000; Rohatgi et al., 2000). Um herauszufinden, ob N-WASP bei der durch die Invasion von *Shigella flexneri* induzierten Aktinreorganisation eine entscheidende Funktion ausübt, wurden N-WASP^{flx/flx} sowie N-WASP^{del/del} Mausfibroblasten (Klon 1 sowie 1H51, s. Tab. 2.1) im Gentamycin Protection Assay untersucht.

Es zeigte sich, dass erstaunlicherweise auch N-WASP nicht für die Aufnahme von *Shigella flexneri* benötigt wird, da die Invasionsrate von Wildtyp-Bakterien in die N-WASP-defizienten Zellen sogar bei über 100 % lag (s. Abb. 3.22).

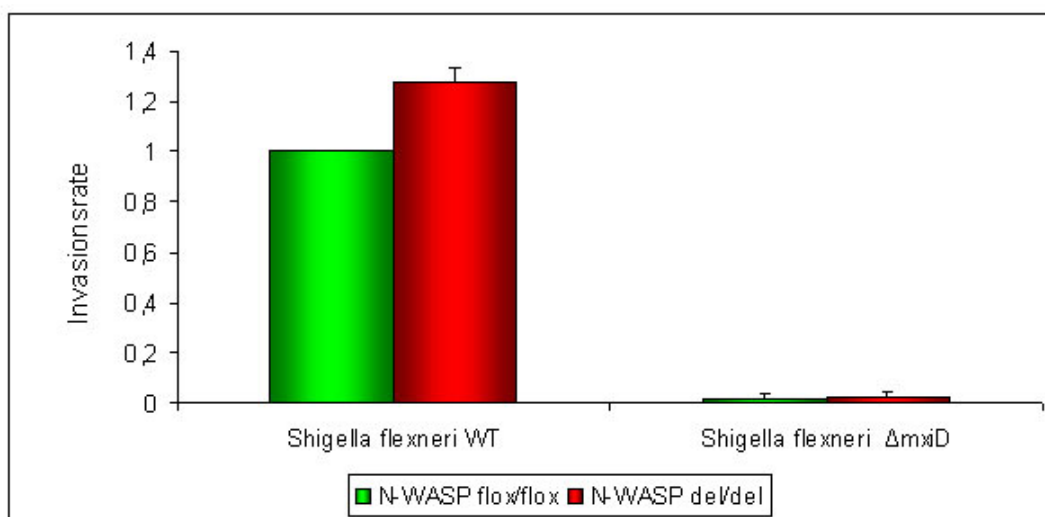


Abbildung 3.22: N-WASP ist für die Invasion von *Shigella flexneri* nicht erforderlich. N-WASP^{flx/flx} (grün) sowie N-WASP^{del/del} Zellen (rot) wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Shigella flexneri* infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da die Rac-abhängige WAVE-Komplex-vermittelte sowie die von N-WASP induzierte Aktinreorganisation keine Rolle für den Invasionsprozess von *Shigella* zu spielen scheint, bleibt zu untersuchen, welcher Signalweg hierbei essentiell ist. Ob der WAVE-Komplex und N-WASP redundante Aufgaben übernehmen, oder ob Rac und Cdc42 über andere Signalwege die Aktinreorganisation bei der Invasion von *Shigella flexneri* vermitteln, könnte durch eine Interferenz mit den Signalwegen beider GTPasen zugleich möglicherweise beantwortet werden (s. auch Kapitel 4.4).

Shigella flexneri gehört wie *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* zu den gram-negativen Enterobacteriaceae. Beide Pathogene vermitteln ihre Invasion über nahezu identische Mechanismen und verfügen über eine Anzahl von Proteinen, die vergleichbare oder homologe Funktionen bei der Invasion übernehmen. Was ihre intrazelluläre Lebensweise angeht, so differieren die Pathogene allerdings stark. In der vorliegenden Doktorarbeit lag das Hauptaugenmerk aber auf der die Invasion von bakteriellen Pathogenen begleitenden Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Sowohl *Shigella* als auch *Salmonella* sind hierbei geeignete Modellorganismen, wobei die Pathogenitätsmechanismen - besonders in Hinsicht auf die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 - von *Salmonella* bereits detaillierter erforscht wurden als jene von *Shigella*. Im Folgenden wird daher die Invasion von *Salmonella typhimurium* hinsichtlich der Aktinreorganisation der Wirtszelle näher analysiert.

3.2.4 Die Rolle der WAVE-Komplex-vermittelten Aktinreorganisation bei der Invasion von *Salmonella typhimurium*

Der gram-negative Salmonellose-Erreger *Salmonella typhimurium* ist mit dem Genus *Shigella* verwandt und vermittelt seine Invasion in nicht-phagozytotische Zellen ebenfalls über den Trigger-Mechanismus (s. Kapitel 1.7.3). Es wird angenommen, dass die bakteriellen Effektorproteine SopB, E und E2 hierbei die Reorganisation des Aktinzytoskeletts durch die Interaktion mit den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac induzieren (Rottner et al., 2005). Welche Proteine die Signale von den GTPasen an die Aktinnukleationsmaschinerie der Wirtszelle weiterleiten, ist auch bei diesem Pathogen noch ungeklärt.

Um zu analysieren, ob Nap1 und somit der WAVE-Komplex eine wichtige Funktion bei der Invasion dieses Pathogens hat, wurden wiederum Gentamycin Protection Assays mit Nap1 RNAi sowie Mock RNAi Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde erneut eine invasionsdefiziente Deletionsmutante mit einem Defekt im Typ III Sekretionssystem verwendet (*Salmonella typhimurium* Δ sipB; s. Kapitel 2.2.1).

Es stellte sich heraus, dass Nap1 und folglich der WAVE-Komplex für die Invasion von *Salmonella typhimurium* nicht benötigt wird (s. Abb. 3.23). Die Invasionseffizienz von Wildtyp-Bakterien in Nap1 RNAi Zellen lag bei über 100 %.

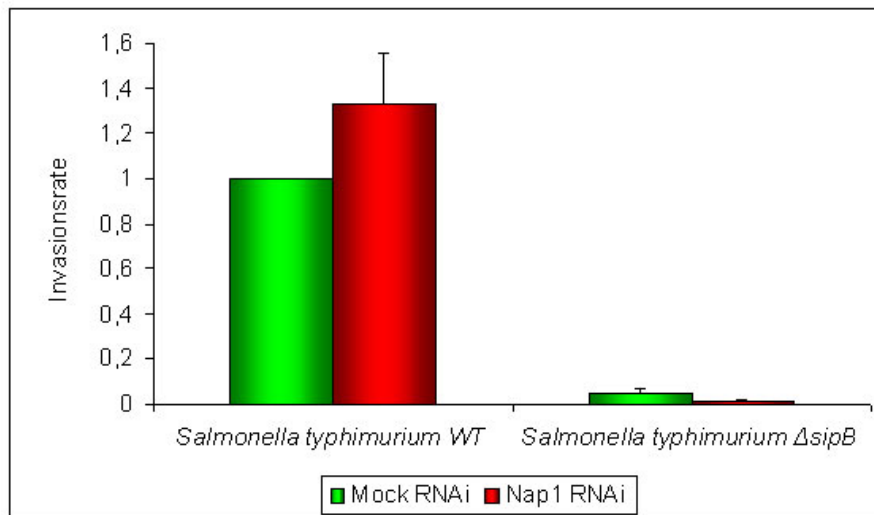


Abbildung 3.23: Nap1 wird für die Invasion von *Salmonella typhimurium* nicht benötigt. Mit Mock RNAi (grün) oder Nap1 RNAi (rot) stabil transfizierte VA-13 Zellen wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Salmonella typhimurium* infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Den Nap1 RNAi Zellen fehlt die Fähigkeit, Rac-abhängige Lamellipodien zu bilden (Steffen et al., 2004). Da *Salmonella typhimurium* prominente Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ in Wirtszellen induziert (Finlay et al., 1991), die von Rac über den WAVE-Komplex vermittelte Aktinreorganisation für die Aufnahme des Pathogens aber offenbar nicht benötigt wird, wurde untersucht, ob *Salmonella typhimurium* dennoch eine Umordnung des Aktinzytoskeletts in Nap1 RNAi Zellen induziert. Mock RNAi sowie Nap1 RNAi Zellen wurden auf mit Fibronektin behandelten Deckgläschen ausgesät (s. Kapitel 2.7.3), 10 min mit *Salmonella typhimurium* infiziert (s. Kapitel 2.7.9) und für die indirekte Immunfluoreszenz weiterbearbeitet (s. Kapitel 2.8.2). Hierbei wurden die Salmonellen mit einem polyklonalen Antikörper (s. Tab. 2.4) angefärbt, während das Aktinzytoskelett mittels Phalloidin visualisiert wurde.

Abbildung 3.24 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit *Salmonella typhimurium* infizierten Zellen. Das Pathogen kann zwar Aktinreorganisation in Nap1 RNAi Zellen induzieren, diese ist morphologisch jedoch anders als in den Mock RNAi Kontrollzellen. Ausgeprägte Lamellipodien fehlen, doch ist direkt unter den Bakterien eine Akkumulation von F-Aktin zu beobachten (rote Sternchen).

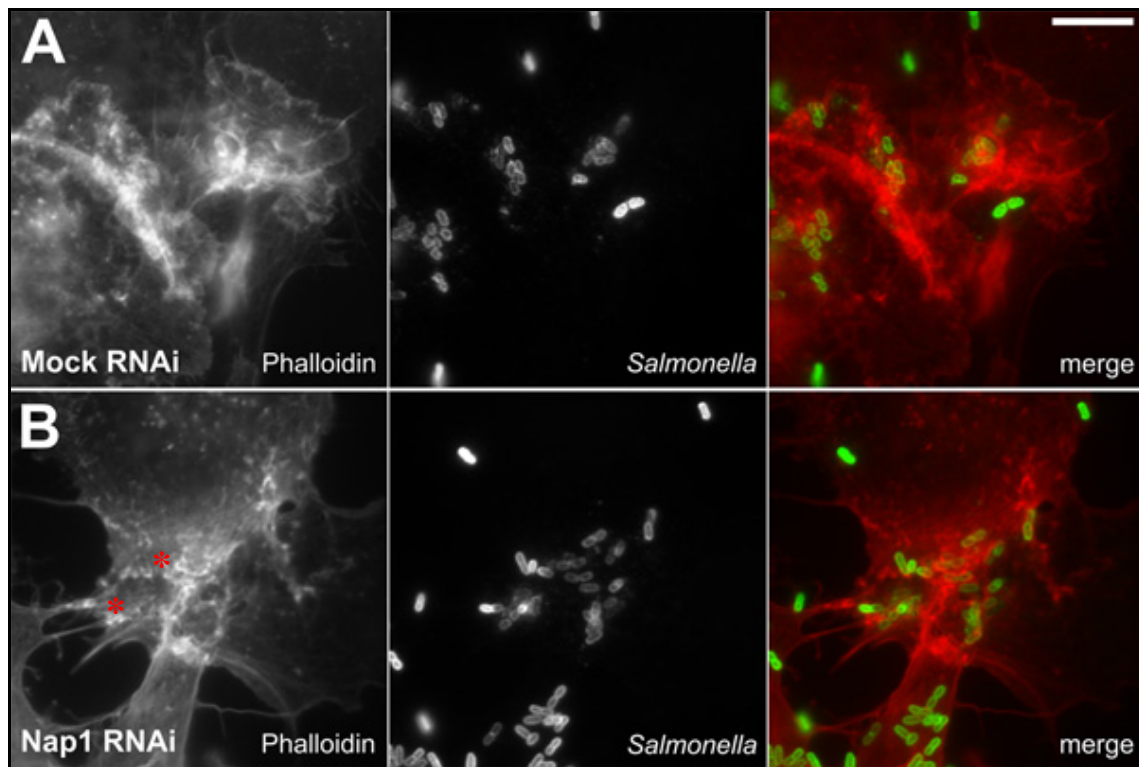


Abbildung 3.24: Die durch *Salmonella typhimurium* induzierte Aktinreorganisation ist in Nap1 RNAi Zellen verändert. Mock RNAi (A; obere Bildreihe) sowie Nap1 RNAi Zellen (B; untere Bildreihe) wurden 10 min mit *Salmonella typhimurium* WT infiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin visualisiert (linkes Bild), die Bakterien wurden mit einem polyklonalen anti-Salmonellen Antikörper angefärbt (mittleres Bild). Rechts außen sind die übereinandergelegten Bilder gezeigt (merge; Aktin: rot, Salmonellen: grün). Der Balken entspricht 10 µm.

Um die durch *Salmonella typhimurium* induzierten Zelloberflächenveränderungen noch detaillierter analysieren zu können, wurden infizierte Mock RNAi sowie Nap1 RNAi Zellen mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Hierfür wurden die Zellen 12 min mit *Salmonella typhimurium* infiziert und wie in Kapitel 2.7.9 beschrieben für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Manfred Rohde, GBF, angefertigt.

Abbildung 3.25a und b zeigt infizierte Kontrollzellen (Mock RNAi). (a) veranschaulicht die durch *Salmonella typhimurium* induzierte Formation von Lamellipodien. Doch die Formation dieser prominenten Aktin-Strukturen ist für den Invasionsprozess dieses Bakteriums nicht zwingend erforderlich, wie Abbildung 3.25b verdeutlicht. Auch ohne die Ausbildung von großflächigen Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ ist *Salmonella typhimurium* fähig, seine Aufnahme zu vermitteln.

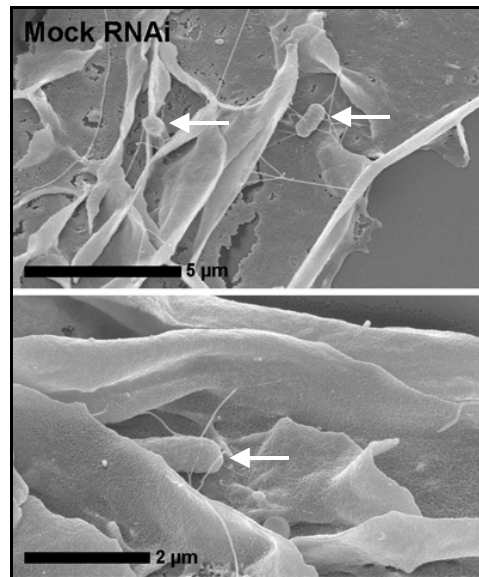


Abbildung 3.25a: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mock RNAi Zellen mit *Salmonella typhimurium*. Mock RNAi Zellen wurden 12 min mit *Salmonella typhimurium* WT infiziert und mittels Elektronenmikroskopie analysiert. (Der Pfeile zeigen auf die Bakterien in den ‚membrane ruffles‘.)

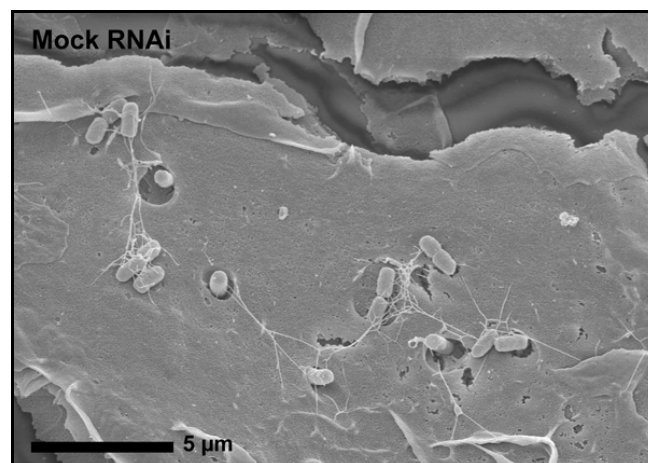


Abbildung 3.25b: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mock RNAi Zellen mit *Salmonella typhimurium*. Mock RNAi Zellen wurden 12 min mit *Salmonella typhimurium* WT infiziert und mittels Elektronenmikroskopie analysiert. Das Pathogen kann seine Invasion auch ohne die Formation großflächiger Lamellipodien und ‚ruffles‘ vermitteln.

So zeigte sich, dass die Invasion von *Salmonella* in Nap1-defiziente Zellen ebenfalls ohne erhebliche Zelloberflächenveränderungen vollzogen werden kann (s. Abb. 3.25c). Die Plasmamembran der infizierten Wirtszelle stülpt sich über das Bakterium, um es aufzunehmen, jedoch entstehen dabei keine großflächigen Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus dem Gentamycin Protection Assay ergibt sich also die Hypothese, dass *Salmonella typhimurium* seine Invasion auch unabhängig von der Formation ausgeprägter Lamellipodien und ‚ruffles‘ induzieren kann.

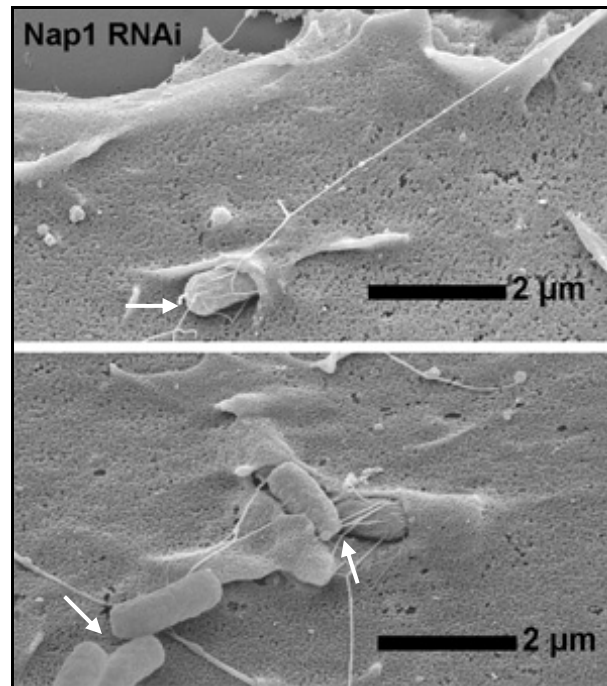


Abbildung 3.25c: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nap1 RNAi Zellen mit *Salmonella typhimurium*. Nap1 RNAi Zellen wurden 12 min mit *Salmonella typhimurium* WT infiziert und mittels Elektronenmikroskopie analysiert. (Die Pfeile weisen auf die Salmonellen.)

3.2.5 Die Arp2/3-Komplex-Lokalisation an der Aufnahmestelle von *Salmonella typhimurium* ist unabhängig vom WAVE-Komplex

Es wurde gezeigt, dass die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte Formation von Lamellipodien für die Invasion von *Salmonella typhimurium* nicht benötigt wird, denn die Pathogene können ohne Weiteres in Nap1-defiziente Zellen eindringen (s.o.). Die Bildung prominenter Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ bleibt hierbei aus, nichtsdestotrotz wird eine gewisse Umordnung des Aktinzytoskeletts in diesen Zellen ausgelöst. Es stellte sich die Frage, ob der Arp2/3-Komplex diese Aktinreorganisation vermittelt. Sollte dies der Fall sein, wäre davon auszugehen, dass der Arp2/3-Komplex nicht über den WAVE-Komplex an die Aufnahmestelle von *Salmonella* rekrutiert wird. Experimentell bedeutet dies, dass der Arp2/3-Komplex sowohl in infizierten Kontrollzellen als auch in Nap1 RNAi Zellen an die Aufnahmestelle von *Salmonella typhimurium* lokalisieren würde.

Es wurden Mock RNAi und Nap1 RNAi Zellen auf Fibronectin ausgesät, 10 min mit *Salmonella typhimurium* infiziert (s. Kapitel 2.7.9) und mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich der Lokalisation des Arp2/3-Komplexes untersucht. Hierbei wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die p16-Untereinheit des Komplexes verwendet. Die Bakterien wurden mit

einem polyklonalen Antikörper (z.V.g. von Prof. Wolf Dietrich Hardt, Zürich) gefärbt, das Aktinzytoskelett wurde mittels Phalloidin visualisiert.

Abbildung 3.26 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen der infizierten Zellen. Der Arp2/3-Komplex lokalisiert sowohl in Kontrollzellen (Mock RNAi, A, obere Bildreihe) als auch in Nap1 RNAi Zellen (B, untere Bildreihe) an der Aufnahmestelle des Bakteriums, an der in beiden Fällen auch eine Verdichtung des Aktinfilamentsystems (s. Phalloidin) zu beobachten ist. Dies bedeutet, dass der Arp2/3-Komplex vermutlich an den durch *Salmonella* induzierten Aktinreorganisationen beteiligt ist, aber nicht ausschließlich über den WAVE-Komplex an die Aufnahmestelle rekrutiert und aktiviert wird.

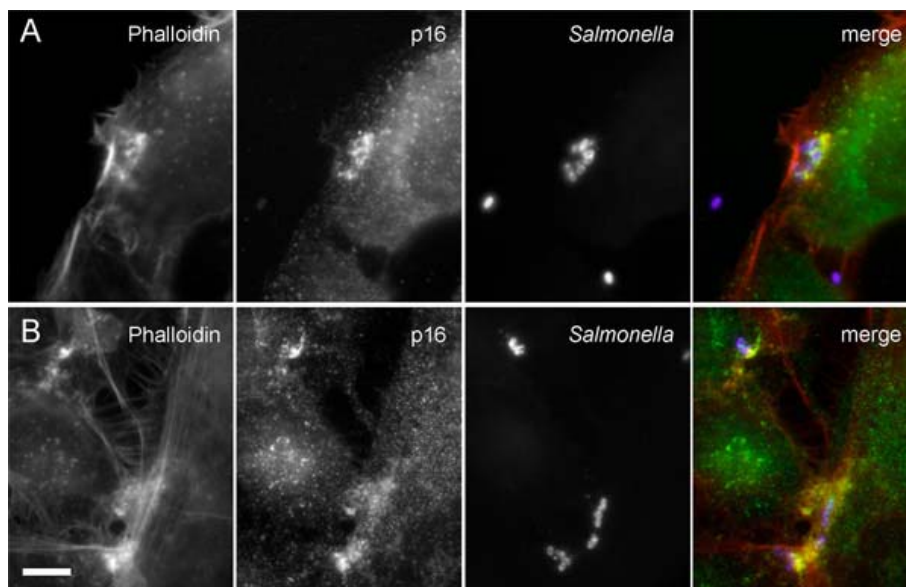


Abbildung 3.26: Lokalisation der Arp2/3-Komplex-Untereinheit p16 an der Aufnahmestelle von *Salmonella typhimurium*. Mock RNAi (A, obere Bildreihe) und Nap1 RNAi Zellen (B, untere Bildreihe) wurden 10 min mit *Salmonella typhimurium* WT infiziert und mittels Immunfluoreszenz auf die Lokalisation der Arp2/3-Komplex-Untereinheit p16 untersucht. Links ist das Aktinzytoskelett mittels Phalloidinfärbung dargestellt, gefolgt von der p16-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 323H3 und der *Salmonella*-Färbung. Rechts außen sind die übereinander gelegten Bilder gezeigt (merge; Phalloidin: rot, p16: grün, Salmonellen: blau), überlagernde Strukturen erscheinen gelb. Der Balken entspricht 10 µm.

3.2.6 Die Funktion von N-WASP bei der Invasion von *Salmonella typhimurium*

Die über den WAVE-Komplex vermittelte, Rac-abhängige Aktinreorganisation wird für die Invasion von *Salmonella typhimurium* nicht benötigt (s.o.), jedoch wird der Arp2/3-Komplex an die Aufnahmestelle des Pathogens rekrutiert. Da dies unabhängig von Nap1 und somit dem WAVE-Komplex geschieht, stellte sich die Frage, ob die von Cdc42 über N-WASP vermittelte Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes bei diesem

Invasionsprozess eine Rolle spielt. Daher wurden weitere Gentamycin Protection Assays mit N-WASP^{flox/flox} und N-WASP^{del/del} Mauszellen (Klon 1 und 1H51, s. Tab. 2.1) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde die invasionsdefiziente Deletionsmutante *Salmonella typhimurium* Δ sipB (s. Kapitel 2.2.1) verwendet. Überraschenderweise ergab sich, dass auch N-WASP bei der Aufnahme des Salmonellose-Erregers nicht benötigt wird (s. Abb. 3.27), denn die Invasionseffizienz von *Salmonella* in N-WASP^{del/del} Zellen lag im Vergleich zu den N-WASP Vorläuferzellen bei über 100%.

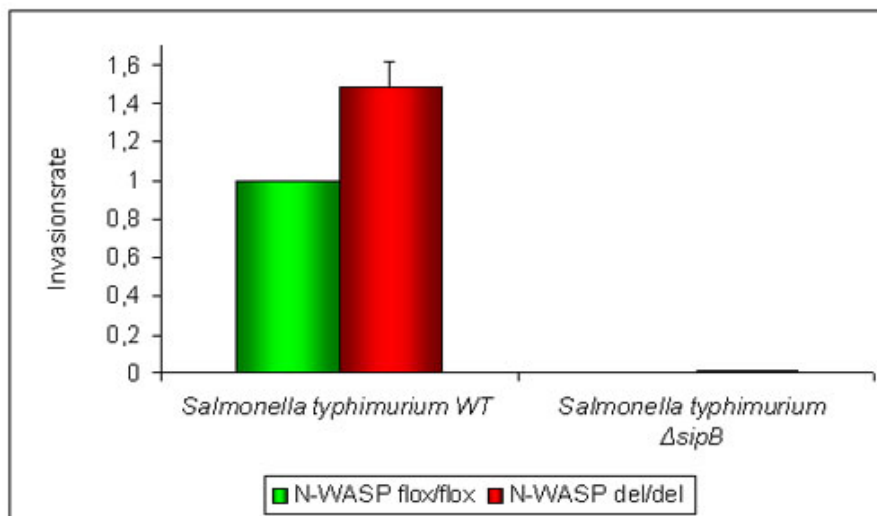


Abbildung 3.27: N-WASP wird für die Invasion von *Salmonella typhimurium* nicht benötigt. N-WASP^{flox/flox} Zellen (grün) sowie N-WASP^{del/del} Zellen (rot) wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Salmonella typhimurium* infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.2.7 Die Rolle von Cdc42 bei der Invasion von *Salmonella typhimurium*

Die kleine Rho-GTPase Cdc42 ist auch über N-WASP hinaus in Aktinreorganisation involviert und stimuliert die Formation von Filopodien (Nobes und Hall, 1995). Durch Bindung und Aktivierung von N-WASP kann die GTPase die Induktion des Arp2/3-Komplexes auslösen (Carlier et al., 1999; Prehoda et al., 2000; Rohatgi et al., 2000). Aber auch über die Interaktion von Cdc42 mit anderen Effektoren wie z.B. mDia2, IRSp53 und p21-aktivierten Kinasen (PAK) wird möglicherweise die Aktinreorganisation und Bildung von Filopodien reguliert (Faix und Rottner, 2005). Anders als zuvor angenommen ist N-WASP in die Formation von Filopodien nicht involviert (Lommel et al., 2001).

Das Humanpathogen *Salmonella typhimurium* verfügt über Virulenzfaktoren, die Cdc42 aktivieren können. Da N-WASP die für die Salmonellen-Invasion nötige Aktinreorganisation nicht induziert (s.o.), sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob Cdc42 über andere

Signalwege eine wichtige Funktion in der Invasion von *Salmonella typhimurium* übernimmt, wobei die Signale von der GTPase über andere Moleküle wie z.B. das Formin mDia2 an das Aktinzytoskelett weitergegeben werden würden.

Es wurden Cdc42-Vorläuferzellen (Cdc42^{+/-}) sowie Cdc42-,knockout' (Cdc42^{-/-}) Zellen (3-9 und 3-9-7; s. Tab. 2.1) im Gentamycin Protection Assay mit *Salmonella typhimurium* untersucht. Interessanterweise stellte sich aber heraus, dass diese GTPase in die Invasion von Salmonellen nicht involviert ist (s. Abb. 3.28), da die Aufnahme von Wildtyp-Salmonellen in Cdc42^{-/-} Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht signifikant beeinträchtigt ist.

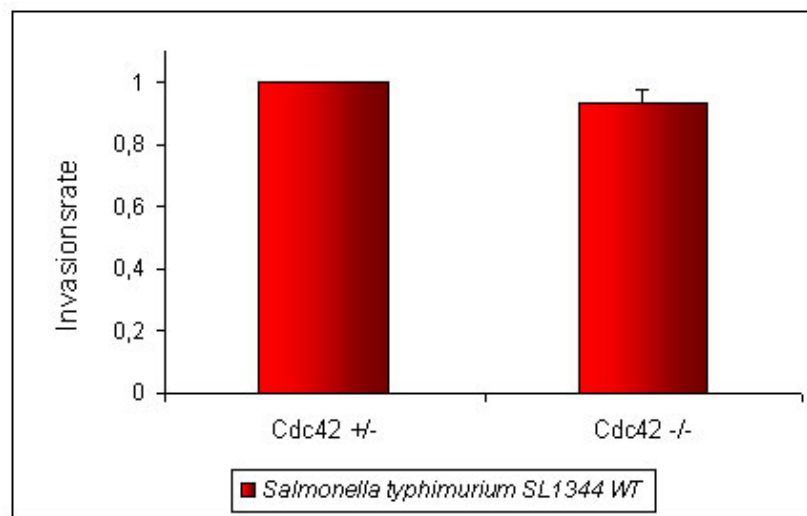


Abbildung 3.28: Cdc42 ist für die Invasion von *Salmonella typhimurium* nicht erforderlich. Cdc42-Vorläufer Zellen (Cdc42^{+/-}) sowie Cdc42-,knockout' Zellen (Cdc42^{-/-}) wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Salmonella typhimurium* infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Invasion von *Salmonella typhimurium* weder über die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte noch über die Cdc42-N-WASP-induzierte Aktinreorganisation bewerkstelligt wird. Da aber postuliert wurde, dass die bakteriellen Effektorproteine SopB, SopE und SopE2 direkt bzw. indirekt mit den Rho-GTPasen Rac und Cdc42 interagieren und sie aktivieren, sollte es eine Verbindung zwischen den Signalwegen der GTPasen und der Invasion von *Salmonella* geben. Daher wurden im Folgenden vergleichende Analysen der Relevanz dieser Virulenzfaktoren für die Aufnahme des Pathogens in Zellen mit Defekten in den Rho-GTPase-Signalwegen durchgeführt. Hierfür wurde die Invasionsfähigkeit diverser *Salmonella*-Mutanten mit Defekten in der Sop-Expression in die oben beschriebenen Zellen untersucht.

3.2.8 Die Invasion von *Salmonella typhimurium* wird über die bakteriellen Effektorproteine SopB, SopE und SopE2 vermittelt

Salmonella typhimurium bedient sich mehrerer Effektorproteine, die direkt mit Rho-GTPasen interagieren und so zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen können (s. Kapitel 1.7.3). Zu diesen Effektoren gehören die „*Salmonella* outer proteins“ SopE und SopE2, welche laut *in vitro*-Daten effiziente Guanin-Austauschfaktoren (GEFs) für Rac und Cdc42 sind (Friebel et al., 2001). Von SopB, einer Inositol-Polyphosphatase, vermutet man, dass es indirekt Cdc42 aktivieren kann (Zhou et al., 2001). Neben diesen Effektorproteinen gibt es zusätzliche bakterielle Faktoren, die direkt mit Aktin interagieren. SipC kann zum einen F-Aktin bündeln und zum anderen Aktin direkt polymerisieren. SipA unterstützt es bei diesem Prozess (McGhie et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte als auch die durch Cdc42 induzierte über N-WASP vermittelte Aktin-reorganisation keine Rolle für die Invasion von *Salmonella typhimurium* spielt (s.o.). Bisher wurden lediglich Wirtszellproteine analysiert, nicht aber die bakteriellen Proteine, die angeblich für eine effiziente Invasion des Pathogens benötigt werden und von denen man vermutet, dass sie mit den untersuchten Wirtszellproteinen (indirekt) interagieren. Die Verwendung entsprechender Bakterien-Mutanten mit Defekten in der Expression der Effektorproteine im Kontext mit den Zelllinien, die Defizienzen in den Signalwegen der Rho-GTPasen aufweisen, würde zum einen die Bedeutung der bakteriellen Proteine für die Invasion aufklären, und zum anderen Hinweise auf ihre Substratspezifität liefern.

Um die Frage zu klären, welche bakteriellen Proteine nun wirklich essentiell für die Invasion von *Salmonella typhimurium* sind, wurden diverse Bakterien-Mutanten untersucht.

Es wurden eine von Dirk Bumann (MHH, Hannover) zur Verfügung gestellte Doppel- und eine Dreifachdeletionsmutante (*Salmonella typhimurium* Δ sopE/sopE2 und Δ sopB/E/E2, s. Kapitel 2.2.1) mittels Gentamycin Protection Assay analysiert. Verwendet wurden die bereits oben beschriebenen humanen Mock RNAi Zellen (VA-13-pSR) und murine Cdc42^{flox/del} Zellen (Cdc42^{+/-}). Als Positivkontrolle wurde der *Salmonella typhimurium* Wildtyp-Stamm eingesetzt.

Es zeigte sich, dass die SopE/E2-defizienten Salmonellen zwar noch in die Zellen eindringen konnten, jedoch war die Invasion dieser Doppelmutante verglichen mit den Wildtyp-Salmonellen beeinträchtigt. Im Falle der humanen Zelllinie VA-13-pSR war die Invasionseffizienz des Pathogens auf etwa 80% herabgesetzt, die Aufnahme des Bakteriums

in die murinen $Cdc42^{+/-}$ Zellen lag nur noch bei etwa 35% (s. Abb. 3.29). Die ungleiche Invasionseffizienz begründet sich höchstwahrscheinlich durch zelltypspezifische Unterschiede. Ähnliches wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, so weist z.B. auch die Invasion von *Listeria monocytogenes* zelltypspezifische Unterschiede auf (Bierne et al., 2005).

Die bakteriellen Effektorproteine SopE und SopE2 spielen demnach eine Rolle in der effizienten Invasion von *Salmonella typhimurium*, doch ist die Aufnahme des Pathogens durch die Abwesenheit der beiden Proteine nicht komplett unterbunden. Dies bedeutet, dass neben SopE und SopE2 weitere bakterielle Proteine für Vermittlung der Invasion ausschlaggebend sein müssen. Um herauszufinden, ob es sich bei dem weiteren bakteriellen Faktor um SopB handelt, von dem angenommen wird, dass es ebenfalls eine wichtige Funktion in der *Salmonella*-Invasion übernimmt ((Bierne et al., 2005; Ehrbar et al., 2002; Miold et al., 2001), wurde eine $\Delta sopB/E/E2$ -Mutante im Gentamycin Protection Assay eingesetzt. Durch Verwendung der Dreifachmutante konnte gezeigt werden, dass SopB die in den Zellen beobachtete Restinvasivität vermittelt. Die Invasion von $\Delta sopB/E/E2$ -Salmonellen war in beiden Zelllinien nahezu komplett unterbunden (s. Abb. 3.29), lediglich etwa 4-5% der eingesetzten Salmonellen wurden noch in die Zellen aufgenommen. Dies bestätigte zudem, dass weitere bakterielle Effektoren wie SipA und SipC (s. Kapitel 1.7.3) in Abwesenheit von SopB/E/E2 keine signifikante Invasion vermitteln können.

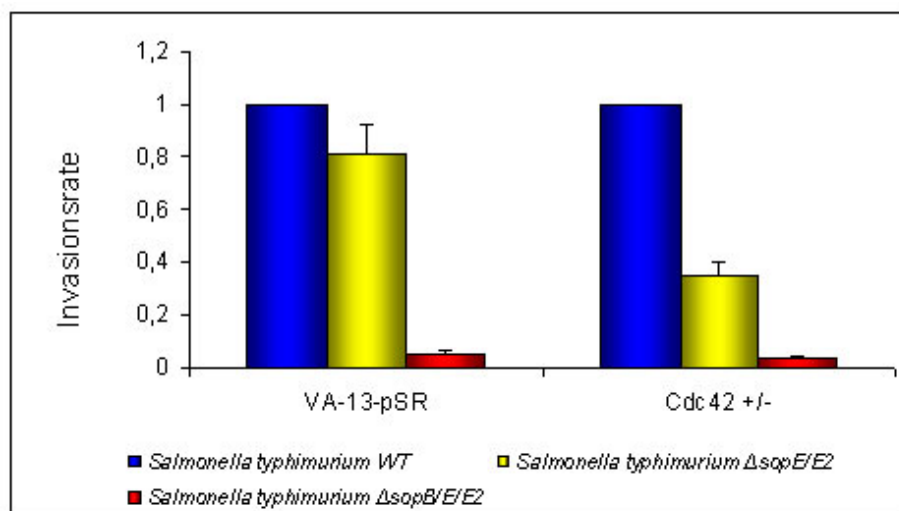


Abbildung 3.29: SopB, E und E2 sind die zentralen bakteriellen Effektoren, die die Invasion von *Salmonella typhimurium* vermitteln. Mit Mock RNAi stabil transfizierte VA-13 Zellen (VA-13-pSR) sowie murine $Cdc42^{+/-}$ Zellen wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Salmonella typhimurium* WT (blau) bzw. $\Delta sopE/sopE2$ (gelb) sowie $\Delta sopB/E/E2$ (rot) infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend lässt sich also zusammenfassen, dass die Invasion von *Salmonella typhimurium* durch die Proteine SopB, E und E2 vermittelt wird, wobei ein Teil der Invasion allein durch SopB induziert wird. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit bereits publizierten Daten überein. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Δ sopB/E/E2-Mutante invasionsdefizient ist (Mirolid et al., 2001). Die Inaktivierung von nur einem der drei bakteriellen Effektoren hatte lediglich eine schwache Reduktion der Invasionseffizienz zur Folge (Hardt et al., 1998; Zhou et al., 2001), während die Invasion von Doppeldeletionsmutanten stärker beeinträchtigt war (Stender et al., 2000). Um zu verstehen, welche Wirtszellfaktoren eine Rolle bei der durch SopB, SopE und SopE2 vermittelten Invasion von *Salmonella typhimurium* spielen, wurden mit den oben genannten Bakterien-Mutanten vergleichende Analysen in Zelllinien durchgeführt, die für die Signalübertragungswege von den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac zur Aktinreorganisation defekt sind.

3.2.9 Die Bedeutung der Signalübertragung von Cdc42 und Rac zur Aktinpolymerisation für die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella typhimurium*

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Invasion von *Salmonella typhimurium* von den bakteriellen Effektorproteinen SopB, E und E2 vermittelt wird (s.o.). Dies steht weitgehend im Einklang mit bereits bestehenden publizierten Daten. Es wurde beobachtet, dass die Inaktivierung von SopE oder SopE2 oder SopB nur zu einer leichten Reduktion der bakteriellen Aufnahme führt, während Salmonellen, denen SopE und SopE2 fehlen, einen stärkeren Defekt in der Invasion aufweisen (Hardt et al., 1998; Stender et al., 2000; Zhou et al., 2001). Wird zusätzlich zu SopE und E2 auch SopB aus dem System entfernt, so ist die Invasion des Pathogens völlig blockiert (Mirolid et al., 2001). Somit wird zumindest ein Teil der Invasion von *Salmonella typhimurium* separat durch SopB vermittelt. Jene Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl für humane als auch murine Zellen bestätigt (s.o.). 2001 wurde postuliert, dass SopB indirekt Cdc42 aktivieren kann (Zhou et al., 2001). Um diese Hypothese zu verifizieren und eine mögliche essentielle Bedeutung dieser Interaktion für die SopB-vermittelte Salmonellen-Invasion zu analysieren, wurden Cdc42^{del/del} Zellen im Gentamycin Protection Assay mit Δ sopE/E2-Salmonellen analysiert, deren Restinvasion auf SopB zurückzuführen ist (s.o.). Als Kontrollen wurden die Cdc42^{flox/del} Zellen sowie Wildtyp- und Δ sopB/E/E2-Salmonellen verwendet. Wenn Cdc42 eine essentielle Rolle in der SopB-

vermittelten Invasion spielt, so sollte die Aufnahme der $\Delta\text{sopE/E2}$ -Salmonellen in Cdc42-defiziente Zellen signifikant reduziert oder unterbunden sein. Es zeigte sich aber, dass die Invasionsrate der $\Delta\text{sopE/E2}$ -Salmonellen in Cdc42^{del/del} Zellen nahezu der Aufnahme in Cdc42^{flox/del} Zellen entsprach (s. Abb. 3.30, Mitte). Somit ist die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella typhimurium* unabhängig von Cdc42.

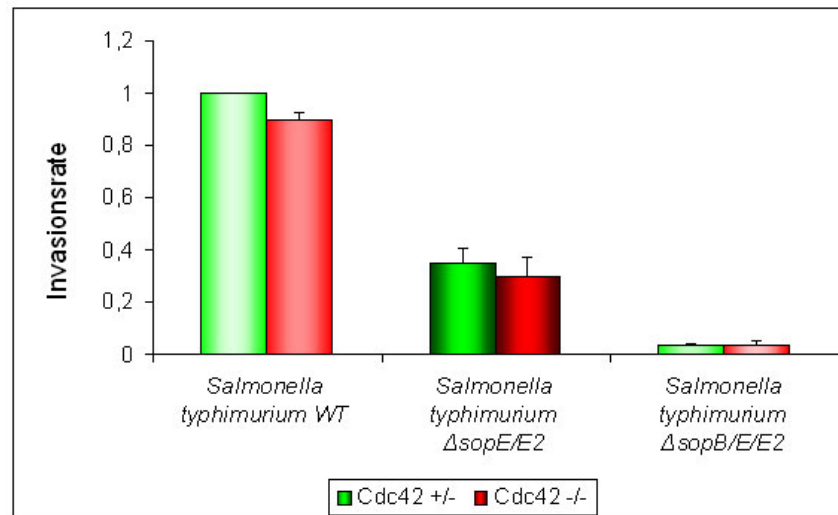


Abbildung 3.30: Die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella typhimurium* ist unabhängig von Cdc42-„Signalling“. Murine Cdc42^{flox/del} Zellen (grün) und Cdc42^{del/del} Zellen (rot) wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Salmonella typhimurium* WT und $\Delta\text{sopE/E2}$ sowie $\Delta\text{sopB/E/E2}$ infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Reduktion der Invasionseffizienz der $\Delta\text{sopE/E2}$ -Mutante um ca. 70% in Cdc42^{flox/del} Kontrollzellen sowie Cdc42^{del/del} Zellen ist wie oben beschrieben auf das Fehlen SopE und SopE2 zurückzuführen (s. Abb. 3.29 in Kapitel 3.2.8).

Die SopB-induzierte Invasion muss also über einen anderen Signalweg als über Cdc42 vermittelt werden. Es ist bekannt, dass Cdc42 Rac aktivieren kann (Nobes und Hall, 1995). Da die eben beschriebenen, in dieser Arbeit verwendeten Zellen Cdc42-defizient sind, kann die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella* aber nicht über diesen Cdc42-Rac-Signalweg erfolgen. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass Rac über einen anderen Signalweg aktiviert wird und eine Rolle bei der SopB-vermittelten Invasion spielt.

Rac kann beispielsweise durch Produkte der PI3-Kinase aktiviert werden (Han et al., 1998; Nimmual et al., 1998). Die PI3-Kinase wurde bisher nur indirekt mit der Invasion von *Salmonella typhimurium* in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass SopB die Phosphorylierung und Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt induzieren kann. Bei der zellulären Signalübertragung geht der Aktivierung von Akt die Aktivierung der PI3-Kinase voran (Osaki et al., 2004). Es wurde beobachtet, dass die durch SopB induzierte Aktivierung

von Akt ebenfalls mit einer Aktivierung der PI3-Kinase einhergeht (Steele-Mortimer et al., 2000), wobei einzuräumen ist, dass die Aktivierung der PI3-Kinase nicht direkt von SopB vermittelt wird und dass ihre Inhibierung durch Wortmannin die Invasion von *Salmonella* nicht blockierte (Steele-Mortimer et al., 2002). Um abzuklären, ob die SopB-induzierte Invasion über eine Aktivierung der PI3-Kinase und weiter über den Rac-Signalweg vermittelt werden kann, wurden in der vorliegenden Arbeit Nap1 RNAi Zellen, in denen die Signalübertragung von Rac zur Aktinpolymerisation defekt ist, mittels Gentamycin Protection Assay mit den Δ sopE/E2-Salmonellen infiziert. Als Kontrollen wurden die Mock RNAi Zellen sowie Wildtyp- und Δ sopB/E/E2-Salmonellen verwendet. Falls Nap1 und somit das Rac-,Signalling' eine essentielle Rolle in der SopB-vermittelten Invasion spielen, so sollte die Aufnahme der Δ sopE/E2-Salmonellen in die Nap1 RNAi Zellen signifikant reduziert oder unterbunden sein. Interessanterweise zeigte sich aber, dass sich die Invasionsrate der Δ sopE/E2-Salmonellen in Nap1 RNAi Zellen und Mock RNAi Zellen nicht unterscheidet (s. Abb. 3.31). Die leichte Reduktion der Invasion im Vergleich zu den Wildtyp-Salmonellen ist auf die Deletion von SopE und SopE2 zurückzuführen.

Demnach ist die Signalübertragung von SopB an Rac und weiter an den WAVE-Komplex vermutlich nicht in die Invasion von *Salmonella typhimurium* involviert.

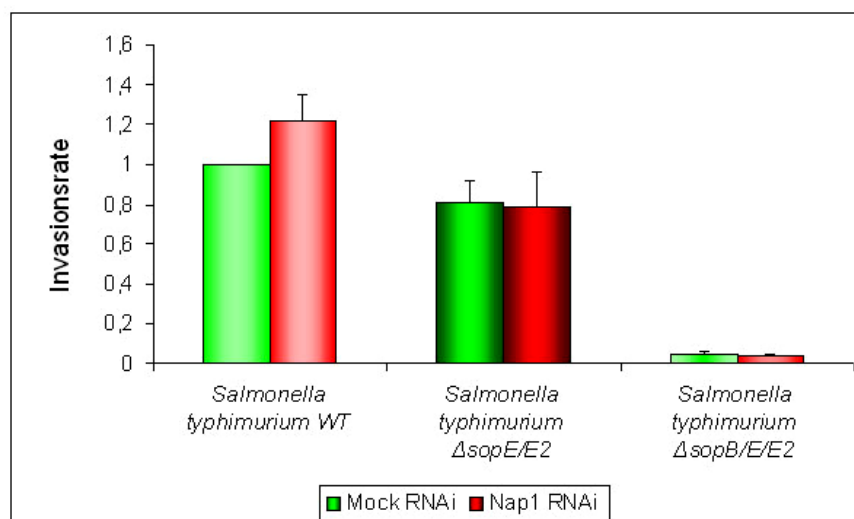


Abbildung 3.31: Die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella typhimurium* ist unabhängig von WAVE-Komplex-vermittelter Aktinreorganisation. Humane Mock RNAi Zellen (grün) und Nap1 RNAi Zellen (rot) wurden mittels Gentamycin Protection Assay mit *Salmonella typhimurium* WT und Δ sopE/E2 sowie Δ sopB/E/E2 infiziert. Gezeigt ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass weder die von Rac über den WAVE-Komplex vermittelte noch die durch Cdc42 induzierte Aktinreorganisation in die durch SopB

ausgelöste Invasion von *Salmonella typhimurium* involviert ist. Weitere Experimente, in denen gleichzeitig mit der Signalübertragung von Cdc42 und Rac interferiert wird, könnten aufzeigen, ob die Inaktivierung der einen GTPase durch die Anwesenheit der anderen kompensiert werden kann, oder ob die Invasion des Pathogens über einen völlig anderen Signalweg vermittelt werden kann.

Möglicherweise übernehmen aber auch die bakteriellen Virulenzfaktoren redundante Funktionen bei der Invasion, wie für SopB, SopE und SopE2 bereits postuliert wurde (Ehrbar et al., 2002). Um die in der Literatur beschriebenen Effekte dieser bakteriellen Proteine unabhängig vom Kontext der bakteriellen Invasion in Wirtszellen studieren zu können, wurden SopE und SopE2 in rekombinanter Form in verschiedenen Zelllinien exprimiert und die von ihnen ausgelöste Signaltransduktion in Hinsicht auf die Aktinreorganisation untersucht (s.u.).

3.2.10 SopE sowie SopE2 induzieren Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ in Cdc42^{flox/del} und Cdc42^{del/del} Zellen

Die bakteriellen Effektorproteine SopE und SopE2 aus *Salmonella typhimurium* stellen *in vitro* effiziente Guanin-Austauschfaktoren der kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 dar. Die GEF-Aktivität der beiden Effektoren wurde in biochemischen Experimenten untersucht. Hierbei wurden die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 sowie als Kontrolle die Ras-GTPase H-Ras analysiert. Es wurde gezeigt, dass SopE GEF-Aktivität für Cdc42 und Rac aufweist, während SopE2 ein Cdc42-spezifisches GEF zu sein scheint. H-Ras konnte weder von SopE noch von SopE2 aktiviert werden, andere GTPasen wurden nicht untersucht (Friebel et al. 2001; Hardt et al., 1998; Stender et al., 2000).

Hardt et al. (1998) konnten zeigen, dass die Transfektion oder Mikroinjektion von rekombinantem SopE bzw. SopE2 in Zellkulturzellen eine starke Umordnung des Aktinzytoskeletts in Form von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ zur Folge hat.

Von SopE ist also zu erwarten, dass es auch in Cdc42-defizienten Zellen Aktinreorganisation auslösen kann, denn die Substratspezifität von SopE beinhaltet auch Rac, welches in den Cdc42^{del/del} Zellen weiterhin zur Verfügung steht. Bei SopE2 sollte aufgrund der *in vitro* auf Cdc42 beschränkten Substratspezifität (Stender et al., 2000) in Cdc42-defizienten Zellen keine prominente Aktinreorganisation mehr induziert werden können.

Es wurden die entsprechenden Zellen ($Cdc42^{\text{flox/del}} = 3-9$ und $Cdc42^{\text{del/del}} = 3-9-7$, s. Tabelle 2.1) auf unbehandelten Coverslips ausgesät. Die Transfektion erfolgte 32 h mit von Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt (ETH, Zürich) zur Verfügung gestellten M45-sopE und -sopE2-Konstrukten (Stender et al., 2000). Danach wurden die Zellen 16 h in DMEM ohne jegliche Zusätze verhungert. Ein Verhungern der Zellen soll die durch im Medium enthaltene Wachstumsfaktoren induzierte Signaltransduktion und damit einhergehende Aktinreorganisation verhindern. Somit sollte der spezifische Effekt von SopE und SopE2 besser analysiert werden können. Die Zellen wurden dann fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz weiterbearbeitet. Zur Anfärbung der transfizierten Zellen wurde ein ebenfalls von Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt zur Verfügung gestellter monoklonaler anti-M45 Antikörper (P7 [KE]) verwendet. Das Aktinzytoskelett wurde mittels Phalloidin visualisiert.

Abbildung 3.32 und 3.33 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von $Cdc42^{\text{flox/del}}$ und $Cdc42^{\text{del/del}}$ Zellen, die M45-sopE oder M45-sopE2 exprimieren. Es ist eindeutig zu erkennen, dass beide bakteriellen Effektoren Lamellipodien in sowohl $Cdc42^{\text{flox/del}}$ als auch $Cdc42^{\text{del/del}}$ Zellen induzieren.

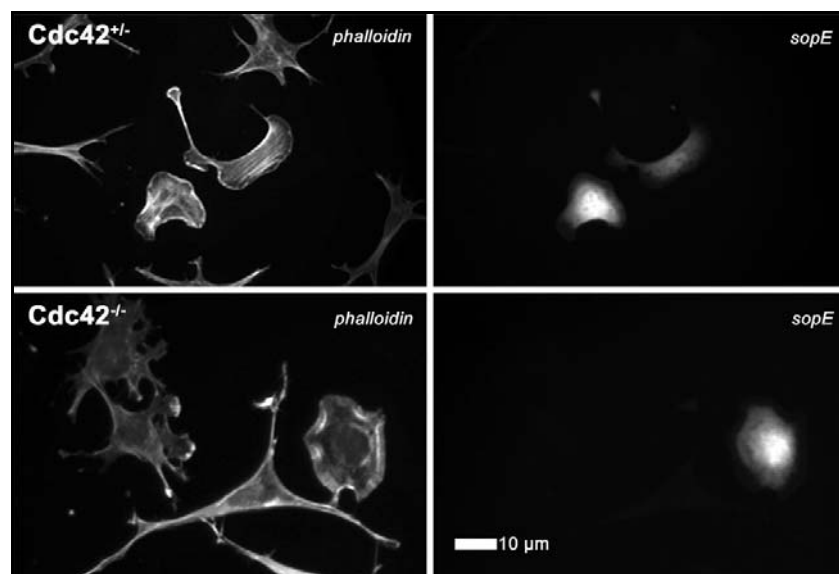


Abbildung 3.32: sopE aus *Salmonella typhimurium* induziert die Ausbildung von Lamellipodien in $Cdc42^{\text{flox/del}}$ sowie $Cdc42^{\text{del/del}}$ Zellen. Mit M45-sopE transfizierte $Cdc42^{\text{flox/del}}$ (obere Bildreihe) und $Cdc42^{\text{del/del}}$ Mauszellen (untere Bildreihe) bilden prominente Lamellipodien. Links ist das mit Phalloidin gefärbte Aktinzytoskelett gezeigt, rechts die M45-sopE-exprimierenden Zellen.

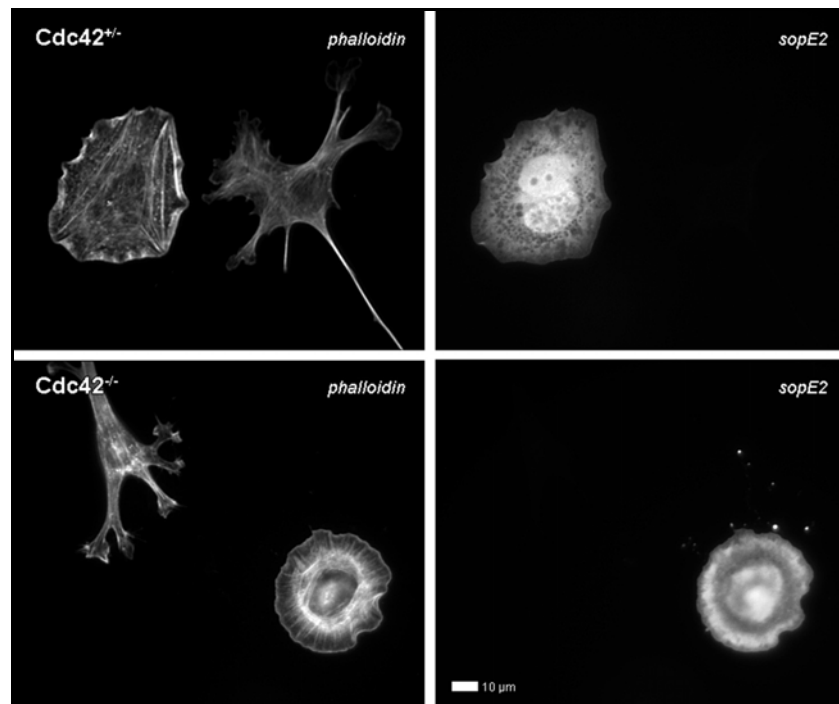


Abbildung 3.33: sopE2 aus *Salmonella typhimurium* induziert die Ausbildung von Lamellipodien in Cdc42^{flox/del} sowie Cdc42^{del/del} Zellen. Mit M45-sopE2 transfizierte Cdc42^{flox/del} (obere Bildreihe) und Cdc42^{del/del} Mauszellen (untere Bildreihe) bilden prominente Lamellipodien. Links ist das mit Phalloidin gefärbte Aktinzytoskelett gezeigt, rechts die M45-sopE2-exprimierenden Zellen.

Zur Quantifizierung dieser zellulären Reaktion auf die Expression der beiden bakteriellen Effektorproteine wurden untransfizierte sowie transfizierte Zellen visuell in drei Kategorien eingeteilt: mit Lamellipodien, ohne Lamellipodien und nicht eindeutig. Es wurden drei unabhängige Versuche ausgewertet, wobei jeweils ca. 200 untransfizierte Zellen und ca. 100 transfizierte Zellen klassifiziert wurden.

Interessanterweise ergab die Auswertung, dass Cdc42^{del/del} Zellen in gleichem Maße mit ‚Ruffle‘- und Lamellipodienbildung auf die Expression von sopE und sopE2 antworten wie die Cdc42^{flox/del} Zellen. Die untransfizierten Kontrollen hingegen bildeten in verhungertem Zustand nur zu einem geringen Prozentsatz Lamellipodien aus (s. Abb. 3.34).

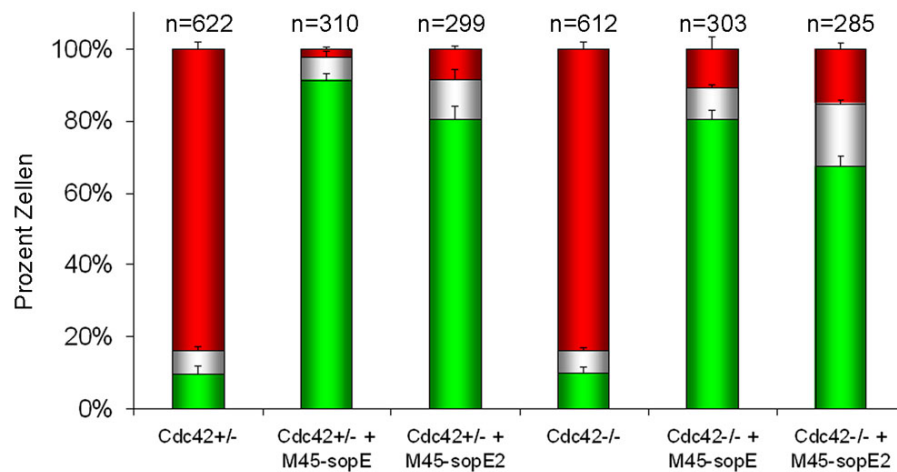


Abbildung 3.34: Die Effektoren sopE und sopE2 aus *Salmonella typhimurium* induzieren Lamellipodienformation in Cdc42^{flox/del} sowie Cdc42^{del/del} Zellen. Quantifizierung von untransfizierten und mit M45-sopE bzw. M45-sopE2 transfizierten Cdc42^{flox/del} sowie Cdc42^{del/del} Zellen in Hinsicht auf Lamellipodienformation. Gezeigt sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern. Die Zellen wurden in folgende Kategorien eingeordnet: grün-mit Lamellipodien, rot-ohne Lamellipodien, weiss-nicht eindeutig (n= Anzahl der Zellen).

Durch die vorangegangenen Experimente wird die Substratspezifität von SopE2 für Cdc42 in Frage gestellt. Die Expression des bakteriellen Effektorproteins löste auch in Cdc42-defizienten Zellen prominente Aktinreorganisation aus. Dies bedeutet, dass Cdc42 nicht der einzige zelluläre Interaktionspartner von SopE2 sein kann, der eine derartige Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts auszulösen vermag. Die Familie der Rho GTPasen beinhaltet inzwischen mehr als 20 Mitglieder, von denen bisher aber nur Rac und Cdc42 hinsichtlich der GEF-Aktivität von SopE2 untersucht wurden (s. Diskussion / Kapitel 4.11).

4 Diskussion

Die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts eukaryotischer Zellen ist in entscheidendem Maße in die Pathogenität zahlreicher bakterieller Pathogene involviert. Daher ist ein besseres Verständnis der Funktion mikrobieller Virulenzfaktoren und der Interaktion von Pathogenen mit ihren Wirtszellen hinsichtlich der Aktindynamik für eine Aufklärung der Infektionsmechanismen dieser bakteriellen Krankheitserreger essentiell. Es ist bekannt, dass die Regulation der Aktindynamik zu einem großen Teil durch die kleinen Rho-GTPasen Rac und Cdc42 vermittelt wird, die ihre Signale über Proteine der WASP/WAVE-Familie an den Arp2/3-Komplex weiterleiten und so Aktinnukleation induzieren können. Die Rho-GTPasen sind direkte oder indirekte Angriffspunkte für eine Vielzahl von bakteriellen Pathogenen, die das Aktinzytoskelett der Wirtszelle für ihre Zwecke ausnutzen. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Rho-GTPase-abhängigen Signalwege für die Interaktion mit den bakteriellen Pathogenen *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* und insbesondere *Salmonella typhimurium* zu analysieren.

4.1 Die WAVE-Proteine lokalisieren an der Spitze von Lamellipodien und sind Komponenten von Proteinkomplexen

Rho-GTPasen agieren als molekulare Schalter, über die bestimmte, externe Signale in eine koordinierte Reihe von intrazellulären Ereignissen umgesetzt werden, welche die für die Zellbewegung benötigte Aktinreorganisation regulieren (Disanza et al., 2005). Die Nukleation und die Polymerisation von Aktinfilamenten, die hierbei für die Formation von zellulären Protrusionen wie Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ erforderlich ist, wird durch den Arp2/3-Komplex vermittelt.

Die Verbindung zwischen den WAVE-Proteinen und der Aktinpolymerisation wurde erstmals durch die Beobachtung hergestellt, dass humanes WAVE1 an den Arp2/3-Komplex binden kann und über diese Interaktion die Nukleation von Aktinfilamenten stimuliert (Machesky und Insall, 1998; Machesky et al., 1999; Miki et al., 1998b). Über die C-terminale Region wird zum einen die Bindung von G-Aktin und zum anderen die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex vermittelt. Sowohl WASP/N-WASP als auch alle drei WAVE-Isoformen verfügen über diese C-terminale Region und können die *de novo*-Aktinnukleation induzieren (Stradal et al., 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass WAVE ‚downstream‘ von Rac agiert und so in die

Regulation der Rac-abhängigen Formation von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ involviert ist (Miki et al., 1998a; Miki und Takenawa, 2003). Die Aktinpolymerisation erzeugt hierbei die für den Vorschub der Plasmamembran benötigte Kraft. Es konnte beobachtet werden, dass WAVE-Proteine an der lamellipodialen Spitze motiler Zellen lokalisieren, was ihre mögliche regulatorische Rolle in der Rac-abhängigen, Arp2/3-Komplex-vermittelten Aktinpolymerisation bekräftigt (Hahne et al., 2001; Nozumi et al., 2003; Miki et al., 1998b). Diese Hypothese wird zusätzlich durch genetische ‚knockout‘-Experimente bestätigt, denn WAVE2^{-/-} Fibroblasten waren in ihrer Fähigkeit, Lamellipodien nach Aktivierung von Rac durch externe Signale zu bilden, stark beeinträchtigt (Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität der hergestellten GFP-WAVE-Konstrukte überprüft. Unter Verwendung eines anti-Pan-WAVE-Antikörpers konnte die Lokalisation von endogenem WAVE2 an der lamellipodialen Spitze motiler B16F1 Zellen gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Lokalisation *in vivo* durch Videomikroskopie von mit den entsprechenden GFP-Fusionskonstrukten transfizierten B16F1 Zellen auch für WAVE1 und WAVE3 bestätigt (s. Kapitel 3.1.3). Dies steht im Einklang mit den bisher publizierten Daten (Hahne et al., 2001; Nozumi et al., 2003).

Wie die WAVE-Aktivität auf molekularem Level reguliert wird, war bis vor kurzem noch völlig unklar. WAVE-Proteine verfügen anders als WASP/N-WASP nicht über eine GTPase-Bindedomäne, d.h. sie können nicht direkt mit Rac interagieren (Stradal et al., 2004). Also muss es Adapterproteine geben, die die Assoziation von WAVE mit Rac vermitteln und sicherstellen, dass die Nukleationsaktivität der WAVE-Proteine reguliert und räumlich auf den Leitsaum der Zelle beschränkt wird. Mehrere Arbeiten verweisen auf die Regulation von WAVE durch multimolekulare Proteinkomplexe, die sich sowohl positiv als auch negativ regulierend auswirken können.

Es wurde z.B. gezeigt, dass WAVE2 über das Insulin-Rezeptor Substrat IRSp53 an aktiviertes Rac binden kann (Miki et al., 2000). Diese mögliche Interaktion wird in Kapitel 4.2 detaillierter beschrieben (s. auch Kapitel 1.6).

Eden et al. (2002) isolierten einen Proteinkomplex aus Rinderhirn, der neben WAVE1 vier weitere Proteine enthielt: Sra-1/PIR121 (‚Specifically Rac associated‘), Nap1 (‚Nck-associated protein‘), Abi (‚Abl-interactor‘) und HSPC300 (‚haemopoietic stem progenitor cell 300‘). WAVE1 liegt in diesem Komplex in inaktiver Form vor. Die Zugabe von aktivem Rac oder dem Adapterprotein Nck führte in dieser Arbeit zu der Dissoziation von WAVE1 und HSPC300 aus dem Komplex und zur Aktivierung von WAVE1. Da diese Daten aus *in vitro*-

Experimenten mit gereinigten Proteinen stammen, bleibt zu hinterfragen, ob diese negativ regulierende Funktion des Komplexes *in vivo* ebenfalls zutreffend ist. Kürzlich erhobene Daten stellen dieses Transinhibitionsmodell in Frage, denn aus zwei unabhängigen Studien geht hervor, dass WAVE-enthaltende Komplexe *in vivo* stabil sind und der Sra-1/Nap1/Abi1-Komplexeil die Arp2/3-Komplex-Aktivierungsfähigkeit von WAVE *in vitro* nicht inhibiert (Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004). Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten anti-WAVE-Antikörper konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem in humanen Fibroblasten (VA-13) und murinen Melanomzellen (B16F1) enthaltenen WAVE-Komplex um die WAVE2-Isoform handelt, da weder WAVE1 noch WAVE3 in diesen Zelllinien auf Proteinlevel nachgewiesen werden konnten (s. Kapitel 3.1.2 und Steffen et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass sämtliche WAVE2-Komplex-Komponenten in lebenden Zellen an der lamellipodialen Spitze lokalisieren. Des Weiteren konnte der Komplex sowohl aus ruhenden Zellen als auch nach Rac-Aktivierung durch Aluminiumfluorid-Behandlung und Überexpression von konstitutiv-aktivem Rac stabil immunopräzipitiert werden. Ferner führte die individuelle Entfernung von Abi1, Sra-1 und Nap1 mittels RNAi zu einer Degradation von WAVE (Blagg et al., 2003; Kunda et al., 2003; Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004).

Vor kurzem wurde auch für das hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimierte WAVE3 beschrieben, dass es in einem ähnlichen Komplex vorliegt. Hierbei interagiert es mit Abi1 und HSPC300, aber auch mit IRSp53 (Stovold et al., 2005).

Die Assoziation aller drei WAVE-Isoformen mit einem Sra-1/Nap1/Abi-Komplex weist womöglich auf eine funktionelle Redundanz der Scar/WAVE-Proteine hin. Jedoch deuten ‚knockout‘-Experimente daraufhin, dass WAVE1 und WAVE2 nicht komplett überlappende Funktionen haben (Dahl et al., 2003; Suetsugu et al., 2003; Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003). Weitere Studien der Scar/WAVE-Proteinfamilie und der mit ihnen assoziierten Proteine werden also zum vollen Verständnis der Funktion und Rolle der WAVE-Komplexe nötig sein.

4.2 IRSp53, IRTKS und FLJ22582 lokalisieren an der lamellipodialen Spitze und interagieren mit Cdc42 und Rac

Das Insulin Rezeptor Substrat p53 (IRSp53) wurde im Jahr 2000 erstmals in Zusammenhang mit der Regulation der Aktindynamik gebracht. Es wurde gezeigt, dass es über ein N-terminales Rac-Bindungsmotiv an die kleine Rho-GTPase Rac binden kann, während es über

seine SH3-Domäne mit WAVE2 interagiert und so möglicherweise die Signalweiterleitung von Rac über WAVE an den Arp2/3-Komplex vermittelt (Miki et al., 2000). Kurze Zeit später wurde beobachtet, dass es über eine zentral gelegene CRIB-Domäne mit Cdc42 interagiert, die Bindung von IRSp53 an Rac konnte in dieser Studie allerdings nicht bestätigt werden (Krugmann et al., 2001). Außerdem stellte sich heraus, dass das Protein –ähnlich wie WASP und N-WASP- in einer autoinhibierten Form vorliegt, die erst durch die Interaktion mit anderen Molekülen aufgehoben werden kann (Krugmann et al. 2001, Miki und Takenawa, 2002). Des Weiteren interagiert IRSp53 mit diversen anderen Proteinen, die für die Signalweiterleitung und die Aktivierung von Rac von Bedeutung sind (s. Kapitel 1.5.4; Connolly et al., 2005; Funato et al., 2004). Doch trotz dieser vielseitigen Erkenntnisse konnte die Rolle und Funktion von IRSp53 für die Aktindynamik noch nicht endgültig geklärt werden. Problematisch hierbei ist das Vorhandensein verschiedener Splice-Varianten des IRSp53-Gens, die sich im C-Terminus des Proteins unterscheiden (Miyahara et al., 2003). So wurde gezeigt, dass die Isoformen differentiell exprimiert und phosphoryliert werden (Okamura-Oho et al., 2001). Die unterschiedlichen, C-terminalen Peptid-Sequenzen spielen daher wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Funktion der Proteine, in dem sie die Zugänglichkeit zu funktionellen Stellen des Proteins regulieren.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass der N-Terminus (bis AS 250) von IRSp53 Aktin-Bündlungsaktivität aufweist und in die Formation von Filopodien involviert ist. Diese vermutlich helikale Domäne ist innerhalb von Vertebraten hoch konserviert. Neben IRSp53 besitzen vier weitere Proteine diese Domäne: MIM (missing in metastasis'), ABBA-1 (actin-bundling protein with BAIAP2 homology'), IRTKS (insulin receptor tyrosine kinase substrate') und FLJ22582. Aufgrund der starken Homologie wurde diese N-terminale Region IMD (IRSp53/MIM-Homologie-Domäne) genannt. Die Überexpression der IMD von IRSp53 oder MIM alleine induzierte Filopodien in HeLa Zellen und die Bildung von dicht gepackten, parallelen Aktinbündeln *in vitro*. Außerdem scheint die IMD-Aktivität des Volllängen-IRSp53 durch Cdc42 und Rac reguliert zu werden (Yamagishi et al., 2004).

Es ist also offensichtlich, dass IRSp53 in die Regulation der Aktindynamik involviert ist. Aufgrund der interessanten, bisher publizierten Daten und der möglichen Verbindung zu WAVE aufgrund der starken Homologie mit IRSp53 wurden in der vorliegenden Arbeit die cDNAs von murinem IRTKS und humanem FLJ22582 als GFP-Fusionskonstrukte kloniert (s. Kapitel 2.4 und 3.1.1) und auf ihre Lokalisation in motilen Zellen hin analysiert. Es zeigte sich, dass beide IRSp53-verwandten Proteine eindeutig an der lamellipodialen Spitze motiler B16-F1 Zellen lokalisieren (s. Kapitel 3.1.5). Diese dynamische Lokalisation lässt eine

funktionelle Rolle dieser Proteine bei der Bildung dieser Strukturen und in der Regulation der Aktindynamik vermuten. Für IRSp53 wurde bereits gezeigt, dass es an der Spitze von Lamellipodien, Filopodien und ‚membrane ruffles‘ lokalisiert (Miki et al., 2000; Nakagawa et al., 2003). Hierbei wurde beobachtet, dass die N-Terminale Region des Proteins für die Lokalisation verantwortlich ist und vermutlich durch Rac und Cdc42 reguliert wird. Auch Yamagishi et al. (2004) untersuchten die N-Terminale Region (IMD) alleine und im Kontext des Volllängen-Proteins und zeigten, dass die Aktivität der IMD durch die Rho-GTPasen reguliert wird und in die Autoinhibition des Proteins involviert ist. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass IRSp53 ein direkter Effektor von Cdc42 und Rac ist, der in Zusammenarbeit mit verschiedenen Proteinen, die über seine SH3-Domäne rekrutiert werden, in die Regulation der kortikalen Aktindynamik involviert ist. Ob die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, IRSp53-verwandten Proteine IRTKS und FLJ22582 ebenfalls über ihre N-Terminale Region an Spitzen aktiver Zellprotrusionen lokalisieren, ebenso autoinhibiert vorliegen und SH3-Domänen-bindende Proteine rekrutieren, bleibt näher zu analysieren. Die Verwendung und Analyse spezieller, verkürzter Konstrukte könnte hierbei in zellulären und biochemischen Experimenten Aufklärung bringen.

Um die kontrovers diskutierte Interaktion von IRSp53 mit Cdc42 und Rac (Govind et al., 2001; Krugmann et al., 2001; Miki et al., 2000; Miki und Takenawa, 2001) näher zu analysieren und erste Einblicke in eine mögliche Interaktion des IRSp53-verwandten IRTKS mit den Rho-GTPasen zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Immunpräzipitationen mit GFP-fusioniertem IRSp53 bzw. IRTKS und myc-getaggten, konstitutiv aktiven GTPasen durchgeführt (s. Kapitel 2.6.7 und 3.1.6). Es zeigte sich, dass beide IMD-enthaltenden Proteine mit sowohl Cdc42 als auch Rac kopräzipitiert werden können. Die Effizienz bzw. die Stärke der Interaktion scheint in gewisser Weise lipidabhängig zu sein, denn die Bindung der IMD-enthaltenden Proteine an die GTPasen war in der Abwesenheit von Detergenzien verstärkt. Insbesondere die Interaktion von IRSp53 mit Rac scheint von der Bindung an Triton-lösliche Komponenten (wie z.B. Phospholipide) abhängig zu sein (s. Abb. 3.16). In der Literatur wurde bereits für WAVE2 beschrieben, dass seine Bindung an PIP₃ relevant für seine Aktivität ist (Oikawa et al., 2004).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse von regulativen Komponenten des Aktinzytoskeletts bei der Interaktion mit diversen bakteriellen Pathogenen. Während dieser Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe die Rolle von IRSp53 bei der Invasion von *Salmonella typhimurium* analysiert und publiziert. Es wurde gezeigt, dass eine Infektion von polarisierten Epithelzellen mit *Salmonella* die Formation eines IRSp53-WAVE2-Komplexes

stimuliert. Doch eine SH3-Domänen-defiziente Mutante von IRSp53, die WAVE2 nicht mehr binden kann sowie die Entfernung von IRSp53 mittels RNAi hatten keinen Effekt auf die Invasionseffizienz des Pathogens (Shi et al., 2005). Daraus wurde geschlossen, dass IRSp53 keine essentielle Rolle in der Invasion von *Salmonella typhimurium* spielt. Die zelluläre Funktion von IMD-enthaltenden Proteinen wie IRSp53 wird in unserer Gruppe im Rahmen anderer Projekte weiterhin untersucht.

4.3 Die WAVE-Komplex-vermittelte Aktinreorganisation ist essentiell für die Internalin B-vermittelte Invasion von *Listeria monocytogenes*

Das gram-positive Tier- und Humanpathogen *Listeria monocytogenes* vermittelt seine Aufnahme in nicht-phagozytotische Wirtszellen über den sogenannten Zipper-Mechanismus, der über zwei separate, aber kooperierende Signalwege eingeleitet wird. Zwei bakterielle Oberflächenproteine – Internalin A (InlA) und Internalin B (InlB) – binden hierbei an Moleküle der Wirtszelloberfläche und lösen so Signalkaskaden aus, die zu der für die Invasion benötigten Aktinreorganisation führen. InlA interagiert mit E-Cadherin, einem Transmembran-Glycoprotein von Epithelzellen, während InlB an den Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor c-Met sowie Glucosaminoglycane bindet. Beide Signalwege werden mit einer Aktivierung der PI3-Kinase und der Rho-GTPase Rac in Verbindung gebracht (Cossart et al., 2003; Cossart und Sansonetti, 2004; Ireton et al., 1996; Kovacs et al., 2002a; Kovacs et al., 2002b). Welche Proteine ‚downstream‘ von Rac in die Invasion von *Listeria* und damit einhergehende Aktinreorganisation involviert sind, war noch nicht hinreichend geklärt.

Mehrere Arbeitsgruppen zeigten kürzlich, dass ein Proteinkomplex die Signalweiterleitung von Rac an den Arp2/3-Komplex, der Aktinnukleation induziert, vermittelt (Eden et al., 2002; Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004). Der Komplex setzt sich, wie oben erwähnt, aus mindestens vier Proteinen zusammen: Sra-1, Nap1, Abi und WAVE, wobei Sra-1 mit Rac interagiert und WAVE das Signal an den Arp2/3-Komplex weiterleiten kann. Es wurde gezeigt, dass die Entfernung einer der Komplexkomponenten z.B. mittels RNAi die Fähigkeit der betroffenen Zellen, Rac-abhängige Lamellipodien und ‚ruffles‘ zu bilden, nahezu komplett blockiert und die Expression der anderen Komponenten stark herunterreguliert (Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nap1 RNAi Zellen stellten also ein optimales System für die Analyse der Rac-abhängigen, WAVE-

Komplex-vermittelten Aktinreorganisation in Bezug auf die Invasion von *Listeria monocytogenes* dar. Die verwendeten Zellen (humane VA-13 Zellen) exprimieren kein E-Cadherin (mit Western Blot und Affymetrix-Analysen überprüft, hier nicht gezeigt), folglich wurde hierbei die InlB-vermittelte Invasion von *Listeria* untersucht. Es zeigte sich, dass die Invasion des Pathogens in Nap1 RNAi Zellen im Vergleich zu den Mock RNAi Kontrollzellen komplett blockiert ist (s. Kapitel 3.2.1). Also ist Nap1 und folglich der WAVE-Komplex essentiell für die InlB-induzierte Aufnahme von *Listeria monocytogenes* in humane VA-13 Zellen. Zudem wurde hier mit Hilfe von Immunfluoreszenz gezeigt, dass die WAVE-Komplex-Komponenten Sra-1 und WAVE2 an der Aufnahmestelle von *Listeria* lokalisieren (s. Kapitel 3.2.2), was die wichtige Funktion des WAVE-Komplexes bei diesem Prozess bekräftigt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Daten. Bierne et al. (2005) zeigten, dass für die InlB-vermittelte Internalisierung von *Listeria monocytogenes* WAVE sowie Abi1 benötigt werden. Hierbei schien das Erfordernis an WASP/WAVE-Proteinen für die listerielle Aufnahme abhängig vom analysierten Zelltyp zu sein. In Vero Zellen wird lediglich die WAVE2-Isoform exprimiert, welche essentiell für die InlB-vermittelte Invasion in diesen Zelltyp ist. In HeLa Zellen hingegen wird neben WAVE2 auch WAVE1 exprimiert, so dass diese Proteine wahrscheinlich redundante Funktionen im Invasionsprozess von *Listeria* übernehmen. N-WASP wiederum wird in beiden Zelltypen exprimiert, spielt aber laut der erhobenen Daten nur in HeLa Zellen eine Rolle für die Invasion des Pathogens. Für Abi1, welches sowohl mit WAVE1 und WAVE2 (Innocenti et al., 2004) als auch mit N-WASP (Innocenti et al., 2005) interagiert, zeigte sich, dass es in beiden untersuchten Zelltypen für die InlB-vermittelte Invasion unbedingt erforderlich ist. Die Proteine des WAVE-Komplexes haben also augenscheinlich eine wichtige Funktion für die InlB-vermittelte Invasion von *Listeria monocytogenes*.

Der WAVE-Komplex vermittelt die Signalweiterleitung von der Rho-GTPase Rac zum Arp2/3-Komplex. Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse lässt sich also die postulierte wichtige Funktion von Rac für die Invasion von *Listeria* indirekt bestätigen. Bierne et al. beobachteten z.B., dass die InlB-vermittelte Invasion von *Listeria* durch die Expression von dominant-negativem Rac in Vero Zellen stark beeinträchtigt war (Bierne et al., 2001). Welche Moleküle ‚upstream‘ von Rac für dessen Aktivierung in Bezug auf die listerielle Aufnahme verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Rac kann z.B. durch die Produkte der ‚upstream‘ liegenden PI3-Kinase aktiviert werden, welche wiederum von InlB aktiviert werden kann (Ireton et al., 1996; Ireton et al., 1999; Welch et al., 2003). Die PI3-Kinase phosphoryliert PIP₂ zu PIP₃, welches durch Bindung an Rac-GEFs wie z.B. Tiam-1,

Vav und Sos die Aktivierung von Rac stimulieren kann (Baumeister et al., 2003; Han et al., 1998; Nimmual et al., 1998). Die Inhibierung der PI3-Kinase durch spezifische Inhibitoren wie z.B. Wortmannin führte zu einer signifikanten Reduktion der Invasionseffizienz von *Listeria monocytogenes* in HeLa-, Vero und Caco-2 Zellen (Ireton et al., 1996). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit lässt sich also vermuten, dass durch die Inhibierung der PI3-Kinase mit der darauffolgenden Rac-Aktivierung interferiert wird, so dass die Rac-abhängige, über den WAVE-Komplex vermittelte Aktinreorganisation, die augenscheinlich wichtig für die Invasion von *Listeria* ist, möglicherweise durch die Inaktivierung der PI3-Kinase indirekt unterbunden werden kann.

Eine wichtige Funktion für die Signalweiterleitung von Rac zur Aktinpolymerisation könnte auch Cdc42 haben, denn Rac kann von Cdc42 aktiviert werden (Nobes und Hall, 1995).

Die Guanin-Austauschfaktoren (GEFs), die die Rho-GTPasen nach Stimulierung der Wirtszelle mit InlB aktivieren können, sind bislang unbekannt.

Es bedarf also noch weiterer Analysen, um ein komplettes und detailliertes Bild des molekularen Aufbaus der Invasion von *Listeria monocytogenes* in nicht-phagozytotische Wirtszellen zu erhalten.

4.4 Die Invasion von *Shigella flexneri* benötigt weder die WAVE-Komplex-vermittelte noch die durch N-WASP induzierte Aktinreorganisation

Der gram-negative, enteropathogene Erreger der bakteriellen Ruhr - *Shigella flexneri* – vermittelt seine Invasion über den sogenannten Trigger-Mechanismus. Hierbei werden über ein Typ III Sekretionssystem (T3SS) bakterielle Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert, die durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts die Formation von Ausstülpungen der Plasmamembran induzieren, über die das Pathogen schließlich aufgenommen wird. Komponenten des T3SS selbst werden zuerst sezerniert, um die spätere Translokation weiterer Effektorproteine zu ermöglichen (Nhieu et al., 2005). Die Invasionsplasmid-Antigene IpaB und IpaC binden aneinander, fügen sich aufgrund ihrer Hydrophobizität in die Wirtszellmembran ein und bilden eine Pore, über die weitere Virulenzfaktoren in die Zelle eingeschleust werden können (Blocker et al., 1999; Harrington et al., 2003). IpaC kann über seinen C-Terminus zumindest *in vitro* direkte Aktinnukleation auslösen und vermag zudem wahrscheinlich die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac indirekt zu

aktivieren (Kuelto et al., 2003; Tran Van Nhieu et al., 1999). IpaA ist ebenfalls in die Aufnahme von *Shigella* involviert. Es bindet und aktiviert Vinculin, welches in fokalen Adhäsionen und bei der Organisation von Aktinfilamenten eine Rolle spielt (Tran Van Nhieu et al., 1997). Durch die Bindung von IpaA wird die Aktinbindungsfähigkeit von Vinculin induziert. Letztendlich wird aber Aktindepolymerisation ausgelöst, die wahrscheinlich den Umbau von lamellipodialen Strukturen zu einer ‚Aktin-Tasche‘ für die Aufnahme von *Shigella* unterstützt (Bourdet-Sicard et al., 2000; Bourdet-Sicard et al., 1999). Ein weiteres bakterielles Effektorprotein, VirA, induziert die Depolymerisation von Mikrotubuli, was wiederum wahrscheinlich durch die indirekte Aktivierung von Rac die Aktinpolymerisation begünstigt (Yoshida et al., 2002). Des Weiteren ist seit kurzem bekannt, dass IpgB1 aus *Shigella* mittels molekularer Mimikry direkt die aktivierte Form der Rho-GTPase Rac nachahmt (Alto et al., 2006). Andere Signalwege, die ‚upstream‘ von Cdc42 und Rac agieren, involvieren die Abl/Arg-Tyrosinkinasen. Durch Phosphorylierung eines Adapterproteins (Crk) können sie die Rho-GTPasen indirekt aktivieren (Burton et al., 2003).

Welche Wirtszellproteine die Signalweiterleitung von den Rho-GTPasen weiter zu der durch *Shigella* induzierten Aktinreorganisation vermitteln, ist nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine mögliche Rolle der Rac-abhängigen, WAVE-Komplex-vermittelten bzw. der Cdc42-induzierten, N-WASP-vermittelten Aktinreorganisation für die Aufnahme von *Shigella flexneri* untersucht.

Die Invasion von *Shigella flexneri* in humane Nap1 RNAi Zellen, die einen Defekt in der Rac-abhängigen Formation von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ aufweisen, war im Vergleich zu Mock RNAi Kontrollzellen nicht beeinträchtigt (s. Kapitel 3.2.3). Die durch *Shigella* induzierte Aktinreorganisation während der Invasion wird folglich nicht über den WAVE-Komplex vermittelt. Da die Signalübertragung von Rac zum Aktinzytoskelett in den hier verwendeten Nap1 RNAi Zellen stark beeinträchtigt ist, kann man vermuten, dass diese Rho-GTPase keine essentielle Rolle für die Invasion von *Shigella flexneri* spielt. Andere Signalwege von Rac zur Aktinpolymerisation als über den WAVE-Komplex sind derzeit jedenfalls nicht bekannt. Durch genetische Deletion von Rac oder die Verwendung von Rac-spezifischen Inhibitoren könnte diese Hypothese weiter untermauert werden.

Die für die Invasion von *Shigella* nötige Aktinreorganisation könnte anstatt des Rac-WAVE-Signalweges aber auch über Cdc42 und N-WASP vermittelt werden. N-WASP wird durch die Interaktion mit dem Phospholipid PIP₂ und Cdc42 aus seiner autoinhibierten in die aktive Konformation überführt und kann nachfolgend die Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinnukleation induzieren (Kim et al., 2000; Prehoda et al., 2000; Rohatgi et al., 2000). Es

wurde bereits gezeigt, dass die intrazelluläre Motilität von *Shigella flexneri* in N-WASP-defizienten Zellen unterbunden ist (Lommel et al., 2001; Snapper et al., 2001). Das bakterielle Oberflächenprotein IcsA rekrutiert N-WASP, welches wiederum den Arp2/3-Komplex aktiviert und Aktinnukleation induziert, so dass das Bakterium sich mittels Aktinschweifbildung durch das Wirtszellzytoplasma fortbewegen kann. Aus diesen Arbeiten war also bekannt, dass *Shigella flexneri* noch in N-WASP^{-/-} Zellen eindringen kann. Ob die Abwesenheit von N-WASP die Invasionseffizienz herabsetzt, wurde hierbei aber nicht hinreichend evaluiert. Falls N-WASP eine Funktion für die Shigellen-Invasion hat, so sollte die Aufnahme des Pathogens in Abwesenheit dieses Proteins beeinträchtigt sein. Die Invasion von *Shigella flexneri* in die in dieser Arbeit verwendeten N-WASP^{-/-} Zellen war aber im Vergleich zu den N-WASP^{+/+} Vorläuferzellen nicht reduziert (s. Kapitel 3.2.3). N-WASP spielt also für die Invasion von *Shigella flexneri* –zumindest in diese Zellen– keine Rolle.

Für das ‚upstream‘ von N-WASP liegende Cdc42 wurde bereits postuliert, dass es eine wesentliche Rolle für die Invasion von *Shigella* spielt. Hierin besteht aber zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse kein Widerspruch, da Cdc42 nicht nur über N-WASP, sondern auch über andere Signalwege Aktinreorganisation induzieren kann. Beispielsweise wurde gezeigt, dass das Formin mDia2 als direkter Effektor von Cdc42 Aktin nukleieren kann (Peng et al., 2003). Eine Studie aus dem Jahr 2002 zeigte, dass die Aufnahme von *Shigella flexneri* in Cdc42^{-/-} Zellen signifikant herabgesetzt ist. Die betroffenen Signalwege sowie die beobachtete Restinvasität des Pathogens in Cdc42^{-/-} Zellen wurden in der Studie aber nicht evaluiert (Shibata et al., 2002).

Die Invasion von *Shigella flexneri* involviert also höchstwahrscheinlich Cdc42, nicht aber N-WASP bzw. den WAVE-Komplex. Eine Beteiligung von Rho wurde ebenfalls bereits postuliert. Durch die Verwendung eines Rho-spezifischen Inhibitors konnte die Invasions-effizienz von *Shigella* und die dabei induzierten Membranausstülpungen beeinträchtigt werden (Adam et al., 1996).

Außerdem wurde Cortactin eine wesentliche Rolle bei der durch *Shigella* induzierten Aktinreorganisation zugesprochen. Cortactin kann über seinen N-Terminus den Arp2/3-Komplex binden und zu dessen Aktivierung beitragen, zudem kann es F-Aktin binden und über seine C-Terminal gelegene SH3-Domäne mit diversen Proteinen wie z.B. N-WASP interagieren (Daly, 2004; Uruno et al., 2001; Weaver et al., 2001; Weed et al., 2001). Die erste Verbindung zwischen Cortactin und der Invasion von *Shigella* wurde 1995 hergestellt. Es wurde gezeigt, dass es an die bakterielle Adhäsionsstelle lokalisiert, wobei sich zeitgleich die Phosphorylierung von Cortactin durch Src-Kinasen erhöht. Die Überexpression von Src

verstärkte dementsprechend die Invasionseffizienz von *Shigella* (Dehio et al., 1995). Auch wurde vor kurzem beobachtet, dass eine Reduktion der Expression von Cortactin mittels RNAi bzw. die Expression von dominant-negativen Cortactin-Mutanten die Invasion von *Shigella* deutlich beeinträchtigte (Bougnères et al., 2004).

Trotz dieser Vielfalt an Informationen ist das Bild des Invasionsmechanismus von *Shigella flexneri* noch lange nicht vollständig und bedarf weiterer detaillierter Analysen.

4.5 Die WAVE-Komplex-vermittelte Aktinreorganisation ist nicht essentiell für die Invasion von *Salmonella typhimurium*

Das gram-negative, fakultativ intrazelluläre Enteropathogen *Salmonella typhimurium* ist mit dem Genus *Shigella* verwandt und verfügt ebenfalls über die Fähigkeit, in normalerweise nicht-phagozytotische Zellen einzudringen. Wie *Shigella* vermittelt es seine Invasion über den sogenannten Trigger-Mechanismus unter Verwendung eines Typ III Sekretionssystems (T3SS). Nach der Adhäsion an z.B. Epithelzellen induziert *Salmonella typhimurium* eine erhebliche Reorganisation des Aktinzytoskeletts, die in der Aufnahme des Pathogens gipfelt. Durch das T3SS werden hierbei bakterielle Virulenzfaktoren in das Zytosol der Wirtszelle transloziert. Zu ihnen gehören z.B. Aktin-bindende, –bündelnde sowie –nukleierende Faktoren und GEFs sowie GAPs für Rho-GTPasen, die allesamt darauf abzielen, lokale Aktinreorganisation an der Stelle der bakteriellen Invasion zu steuern (Rottner et al., 2004).

Einige Komponenten des T3SS, die den Kontakt zur Wirtszelle herstellen und eine Pore bilden, durch die weitere bakterielle Faktoren transloziert werden, können selbst als Effektoren agieren (Coombes und Finlay, 2005). Einer der Porenbildner, SipC, kann über seinen N-Terminus Aktin binden, während sein C-Terminus *in vitro* Aktinnukleationsaktivität aufweist (Hayward und Koronakis, 1999). Eine weitere Komponente des T3SS, SipA, kann dabei mit SipC kooperieren (McGhie et al., 2001). Es kann direkt an Aktin binden, setzt die kritische Konzentration für die Aktinpolymerisation herab und inhibiert die Depolymerisation, indem es mit ADF/Cofilin um die Bindung an F-Aktin konkurriert. Außerdem ist es *in vitro* fähig, durch Gelsolin geschnittene Aktinfilamente wieder zusammenzufügen (McGhie et al., 2004; Zhou et al., 1999). Zu den durch das T3SS in das Wirtszellzytosol sezernierten Effektoren, die direkt oder indirekt mit Aktin oder Regulatoren der Aktinpolymerisation interagieren, gehören auch die ‚*Salmonella* outer proteins‘ (Sop). SopE und SopE2 sind Guanin-Austauschfaktoren (GEFs) für Cdc42 und Rac, wobei die Spezifität von SopE2 *in vitro* auf Cdc42 beschränkt zu sein scheint, während SopE *in vitro*

beide GTPasen aktivieren kann (Friebe et al., 2001; Hardt et al., 1998). SopB ist eine Inositol-Polyphosphatase, die durch Veränderung des Phosphoinositid-Pegels die Verbindung der Membran mit dem Zytoskelett abschwächt und so die Formation von ‚membrane ruffles‘ fördert (Terebiznik et al., 2002). Außerdem wurde postuliert, dass seine Aktivität indirekt zu einer Aktivierung von Cdc42 führt (Zhou et al., 2001). Ein weiterer Effektor, SptP, weist GAP-Aktivität für Rac und Cdc42 auf. Es wird angenommen, dass so nach erfolgter Aufnahme von *Salmonella* die Reorganisation des Aktinzytoskeletts wieder in den Normalzustand überführt wird (Fu und Galán, 1999; Kubori und Galán, 2003).

Den Rho-GTPasen Rac und Cdc42 wird also auch bei der Invasion von *Salmonella typhimurium* eine wichtige Rolle zugesprochen. Welche Proteine oder Proteinkomplexe von diesen GTPasen zur Aktinreorganisation bei der Invasion von *Salmonella* aktiviert werden, ist nicht geklärt. Durch Analyse von Nap1 RNAi Zellen in Infektionsexperimenten wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte Aktinreorganisation für Invasion des Salmonellose-Erregers von Bedeutung ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von *Salmonella typhimurium* in Nap1 RNAi Zellen im Vergleich zu Mock RNAi Zellen nicht beeinträchtigt ist (s. Kapitel 3.2.4). Folglich wird die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte Aktinreorganisation nicht für die Invasion des Pathogens benötigt. Diese Ergebnisse sind kontrovers zu kürzlich publizierten Daten. Es wurde postuliert, dass WAVE bzw. der WAVE-Komplex sehr wohl eine wichtige Rolle für effiziente Invasion von *Salmonella typhimurium* spielt (Shi et al., 2005). WAVE lokalisiert laut dieser Studie an die Aufnahmestelle von *Salmonella* in HeLa Zellen. Die Expression eines verkürzten WAVE-Proteins (WAVE Δ WA), von dem angenommen wird, dass es mit dem endogenen Wildtyp-Protein interferiert und dessen Aktivität inhibiert, resultierte in einer leicht reduzierten Invasionseffizienz von *Salmonella typhimurium* (Unsworth et al., 2004). Die Überexpression von dominant-negativen Proteinen wird aber kontrovers diskutiert.

Für polarisierte Epithelzellen wurde gezeigt, dass die Entfernung von WAVE2 bzw. Abi1 mittels RNAi die Invasionseffizienz von *Salmonella* im Vergleich zu Kontrollzellen auf ca. 50% herabsetzt. Die Invasion von *Salmonella typhimurium* in Abi1 RNAi HeLa Zellen war aber noch stärker reduziert als in MDCK-Epithelzellen (Shi et al., 2005). Die Interpretation von Resultaten mit Abi1 RNAi Zellen wird jedoch durch dessen Beteiligung an verschiedenen Proteinkomplexen, die z.B. in die Rac-Aktivierung (Innocenti et al., 2003) oder die Rezeptor-Internalisierung (Innocenti et al., 2005) involviert sind, verkompliziert. Defekte in Abi1 RNAi Zellen könnten daher auch von dessen Interaktionen mit anderen Faktoren als dem WAVE-Komplex herrühren.

Da *Salmonella* ungehindert in die Nap1 RNAi Zellen eindringen kann, wurde untersucht, ob es bei der Invasion überhaupt zu einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts kommt. Mittels Immunfluoreszenz wurde daher analysiert, ob *Salmonella* Aktinreorganisation in den verwendeten Zellen induziert. Sowohl in Mock RNAi Kontrollzellen als auch Nap1 RNAi Zellen wurde die Bildung von Zelloberflächenveränderungen ausgelöst, wobei das Ausmaß der Aktinreorganisation in Nap1 RNAi Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich verändert ausfiel (s. Abb. 3.24). Um die durch *Salmonella typhimurium* induzierten Oberflächenveränderungen der Zellen detailliert analysieren zu können, wurden infizierte Kontroll- und Nap1 RNAi Zellen mittels Elektronenmikroskopie beobachtet. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass das Pathogen seine Invasion entgegen früherer Annahmen (Finlay et al., 1991) auch ohne die Induktion von prominenten Lamellipodien und ‚ruffles‘ vermitteln kann. In infizierten Kontrollzellen wurden neben Zellen, in die die Salmonellen unter Induktion dieser Strukturen eindrangen, auch Zellen entdeckt, die die Bakterien ohne Ausbildung von ausgeprägten Oberflächenveränderungen aufnahmen (s. Abb. 3.25b). Die Invasion von *Salmonella* in Nap1 RNAi Zellen geht hingegen immer ohne die Induktion von erheblichen Ausstülpungen und Auffaltungen der Zelloberfläche einher (s. Abb. 3.25c). Nichtsdestotrotz findet eine Umhüllung des Pathogens durch die Plasmamembran der Zelle bei der Invasion statt, wobei die hierfür benötigte Aktinreorganisation aber über andere Signalwege als über den WAVE-Komplex vermittelt werden muss.

4.6 Die Arp2/3-Komplex-Lokalisation an der Aufnahmestelle von *Salmonella typhimurium* wird nicht über den WAVE-Komplex vermittelt

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte Aktinreorganisation für die Invasion von *Salmonella typhimurium* in humane VA13 Zellen nicht benötigt wird. Dennoch wird eine gewisse Veränderung der Oberfläche von Nap1 RNAi VA-13 Zellen dabei ausgelöst. Um herauszufinden, ob der prominenteste Aktinnukleator, der Arp2/3-Komplex, an die Aufnahmestelle von *Salmonella typhimurium* lokalisiert und ob diese Rekrutierung vom WAVE-Komplex vermittelt wird, wurden Mock RNAi Kontrollzellen und Nap1 RNAi Zellen mit *Salmonella typhimurium* infiziert und mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Antikörpers gegen die p16-Untereinheit

des Arp2/3-Komplexes gefärbt. Es zeigte sich, dass der Arp2/3-Komplex sowohl in Kontrollzellen als auch in Nap1 RNAi Zellen an die an der Aufnahmestelle des Pathogens induzierten Aktinstrukturen lokalisierte (s. Abb. 3.26). Also ist der Arp2/3-Komplex zwar an der durch *Salmonella* induzierten Aktinreorganisation beteiligt, wird aber nicht über den WAVE-Komplex rekrutiert und aktiviert. Eine Möglichkeit wäre, dass die mit der Salmonellen-Invasion einhergehende Aktinreorganisation von Cdc42 und N-WASP oder über Cortactin vermittelt wird, wobei letztere ebenso wie WAVE befähigt sind, den Arp2/3-Komplex zu aktivieren.

4.7 N-WASP hat keine essentielle Funktion bei der Invasion von *Salmonella typhimurium*

Es wurde bereits postuliert, dass sowohl N-WASP als auch Cdc42 eine essentielle Rolle für eine effiziente Invasion von *Salmonella typhimurium* spielen. Jedoch wurden hierbei dominant-negative Proteine analysiert (Unsworth et al., 2004). Die Untersuchung von ‚knockout‘ Zelllinien, die auf genetischer Ebene defizient für die jeweiligen Proteine sind, stellt zweifelsohne eine optimale Methode dar, um die Funktion dieser Proteine für die bakterielle Invasion zu studieren. So wurden in der vorliegenden Arbeit murine, fibroblastoide N-WASP^{-/-} Zellen in Invasionsexperimenten mit *Salmonella typhimurium* analysiert. Die Invasion des bakteriellen Pathogens in die N-WASP-defekten Zellen war im Vergleich zu den Vorläuferzellen (N-WASP^{flox/flox}) nicht beeinträchtigt (s. Kapitel 3.2.6). N-WASP-vermittelte Aktinreorganisation ist demzufolge für die Invasion von *Salmonella typhimurium* nicht erforderlich.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse stellt sich die Frage, wie die durch *Salmonella* induzierte Aktinreorganisation vermittelt wird, wenn weder der WAVE-Komplex noch N-WASP hierbei eine Rolle spielen. Es besteht die Möglichkeit, dass die beiden Signalwege eine redundante Funktion übernehmen. Dies bleibt z.B. durch zeitgleiche Interferenz mit sowohl WAVE als auch N-WASP zu untersuchen. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass andere Wirtszellproteine die Signalweiterleitung an die Aktinnukleationsmaschinerie übernehmen. Z.B. wurde von Cortactin bereits gezeigt, dass es in den durch *Salmonella* induzierten Aktinstrukturen lokalisiert. Aber eine Entfernung von Cortactin mittels RNAi hatte zumindest in einer kürzlich publizierten Studie keinen negativen Effekt auf die Invasionsfähigkeit des Pathogens (Unsworth et al., 2004).

4.8 Cdc42 wird nicht für die Aufnahme von *Salmonella typhimurium* benötigt

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Rac-abhängige, WAVE-Komplex-vermittelte sowie die durch N-WASP induzierte Aktinreorganisation für die Invasion von *Salmonella typhimurium* keine Bedeutung haben. N-WASP kann von Cdc42 aktiviert werden (Rohatgi et al., 2000). Die Annahme, dass Cdc42 möglicherweise über N-WASP die durch die Salmonellen-Invasion ausgelöste Aktinreorganisation vermittelt, erwies sich aufgrund von Infektionsexperimenten mit N-WASP^{-/-} Zellen als nicht korrekt (s. Kapitel 3.2.6 und 4.7). Da Cdc42 sich aber ‚upstream‘ von N-WASP befindet, besteht die Möglichkeit, dass Cdc42 doch in die Invasion von *Salmonella typhimurium* involviert ist, wobei die Signalweiterleitung dann über andere Moleküle als N-WASP stattfinden müsste.

Eine wichtige Funktion von Cdc42 für die Invasion von *Salmonella typhimurium* wurde bereits mehrfach beschrieben (Chen et al., 1996; Stender et al., 2000; Unsworth et al., 2004), jedoch wurden die Daten allesamt aufgrund von Experimenten mit dominant-negativem Cdc42 erhoben. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass die Effekte von dominant-negativem Cdc42 keine Rückschlüsse auf das Wildtyp-Protein zulassen. So wurde gezeigt, dass Cdc42^{-/-} Zellen vergleichbar zu Kontrollzellen Filopodien bilden können. Deren Formation kann in diesen Zellen durch die Expression von dominant-negativem Cdc42 jedoch nicht überzeugend unterbunden werden (Czuchra et al., 2005). Hierbei besteht die Möglichkeit, dass dominant-negatives Cdc42 diverse GEFs sequestriert, die auch andere verwandte Rho-GTPasen aktivieren können, so dass sich der Effekt nicht nur auf Cdc42 beschränkt. Das Gesamtbild ist also komplexer. So wurde z.B. kürzlich ein alternativer Weg zur Filopodienbildung über die Rho-GTPase Rif vorgestellt (Pellegrin und Mellor, 2005).

Also lässt sich die postulierte wichtige Funktion von Cdc42 für die Invasion von *Salmonella typhimurium* in Frage stellen. Die Analyse von genetisch Cdc42-defizienten Zellen sollte diese Fragestellung beantworten können. So wurden in der vorliegenden Arbeit murine, parentale Vorläuferzellen und Cdc42^{-/-} Zellen in Invasions-experimenten mit *Salmonella typhimurium* analysiert. Es stellte sich heraus, dass die GTPase für die Salmonellen-Invasion nicht benötigt wird, da die Aufnahme des Pathogens in die ‚knockout‘ Zellen nahezu der in Cdc42-exprimierenden Vorläuferzellen entsprach (s. Kapitel 3.2.7).

Es ist also gezeigt, dass die Invasion von *Salmonella typhimurium* weder alleine von der Rac-abhängigen, WAVE-Komplex-vermittelten noch von der über Cdc42 und N-WASP vermittelten Aktinreorganisation abhängig ist. Gegebenenfalls übernehmen diese Signalwege

redundante Funktionen. Denkbar wäre aber auch, dass andere Signalwege die für die Salmonellen-Invasion benötigte Aktinreorganisation vermitteln, da es inzwischen über 20 Mitglieder der Rho-GTPasen-Familie gibt, von denen einige ähnliche Effekte wie Rac und Cdc42 bezüglich der Aktinreorganisation aufweisen (s.u.).

4.9 Die Invasion von *Salmonella typhimurium* wird über die bakteriellen Effektorproteine SopE, SopE2 und SopB vermittelt

Um weitere Einblicke in die Funktion der Rho-GTPasen bei der Invasion von *Salmonella typhimurium* zu erlangen, wurden in komplementären Analysen Virulenzfaktoren des Pathogens untersucht. Dabei wurden besonders SopB, SopE und SopE2 betrachtet. Biochemische Analysen demonstrierten, dass die ‚*Salmonella* outer proteins‘ SopE und SopE2 *in vitro* als Guanin-Austauschfaktoren für Rac und Cdc42 agieren, wobei sich die Spezifität von SopE2 auf Cdc42 zu beschränken scheint (s.o., Friebe et al., 2001; Hardt et al., 1998; Stender et al., 2000). Die Inositol-Polyphosphatase SopB scheint die Invasion durch die indirekte Aktivierung von Cdc42 und durch die Veränderung des Phosphoinositol-Pegels der Wirtszelle zu begünstigen (Terebiznik et al., 2002; Zhou et al., 2001).

Um die Effekte dieser Virulenzfaktoren genau untersuchen zu können, wurden sie schon in anderen Studien in isolierter Form in Wirtszellen zur Expression gebracht. Hierbei zeigte sich, dass jeder dieser Effektoren erhebliche Umordnungen des Aktinzytoskeletts induzieren kann (Hardt et al., 1998; Stender et al., 2000; Zhou et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass SopE, SopE2 und SopB zumindest teilweise redundant sind. In komplementären Analysen wurde die Invasion von *Salmonella*-Mutanten untersucht, denen ein oder mehrere der oben genannten Faktoren fehlten. Doppelmutanten von *Salmonella*, denen SopE und SopE2 fehlen, sind in ihrer Invasion beeinträchtigt, eine Deletion aller drei Proteine führt zu einer annähernd kompletten Inhibierung der Internalisierung (Mirol et al., 2001; Stender et al., 2000). Da in der vorliegenden Arbeit bisher nur die Wirtszellseite bezüglich der Invasion von *Salmonella typhimurium* untersucht wurde, sollten die eben beschriebenen Daten unter Verwendung von verschiedenen *Salmonella*-Mutanten zunächst verifiziert werden. Danach sollte vor allem unter Zuhilfenahme der Nap1 RNAi bzw. Cdc42-defizienten Zellen die mutmaßliche Substratspezifität von SopE, SopE2 und SopB untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Invasion von Δ sopE/E2-Salmonellen in sowohl humane VA-13 Zellen (Mock RNAi) als auch in murine Cdc42^{+/-}

Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Salmonellen beeinträchtigt war (s. Kapitel 3.2.8). Dabei war die Aufnahme in die Mausfibroblasten stärker reduziert als in humane Fibroblasten, was auf zelltypspezifische Unterschiede schließen lässt. Die Restinvasivität der verwendeten Bakterien ließ sich durch weitere Experimente auf SopB zurückführen, denn die Aufnahme von SopB/E/E2-defizienten Salmonellen war im Vergleich zu Wildtyp-Salmonellen in beiden Zelllinien nahezu komplett inhibiert (s. Abb. 3.29). *Salmonella typhimurium* vermittelt seine Invasion also über SopE, SopE2 und SopB, wobei ein Teil der Aufnahme ausschließlich über SopB vermittelt wird.

4.10 Die SopB-induzierte Invasion von *Salmonella typhimurium* wird nicht über Cdc42- und Rac-abhängige Signalwege vermittelt

Es wurde postuliert, dass die Inositolphosphatase SopB aus *Salmonella typhimurium* die Rho-GTPase Cdc42 indirekt aktivieren kann. Durch Expression von dominant-negativem Cdc42 bzw. Rac und anschließende Infektion der Zellen mit diversen *Salmonella typhimurium*-Mutanten wurde gezeigt, dass die SopB-vermittelte Aufnahme von Cdc42, nicht aber von Rac abhängig ist (Zhou et al., 2001). Dass dominant-negative Proteine aber keine effektiven Rückschlüsse auf das Wildtyp-Protein zulassen, wurde bereits oben diskutiert. Also wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von genetisch Cdc42-defizienten (Cdc42^{-/-}) Zellen erneut die Funktion dieser Rho-GTPase für die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella typhimurium* untersucht. Es wurden Invasionsexperimente der Cdc42^{-/-} Zellen und der dazugehörigen Kontrollzellen (Cdc42^{+/-}) mit Wildtyp-, Δ sopB/E/E2- und Δ sopE/E2-Salmonellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die SopB-vermittelte Invasion der Δ sopE/E2-Bakterien in Cdc42^{-/-} Zellen der in Cdc42-exprimierenden Vorläuferzellen (Cdc42^{+/-}) entsprach (s. Abb. 3.30). Die SopB-induzierte Aufnahme von *Salmonella typhimurium* wird also nicht von Cdc42-abhängigen Signalwegen vermittelt.

Natürlich besteht die Möglichkeit, dass es zelltypspezifische Unterschiede in der Invasion von bakteriellen Pathogenen geben könnte, wie es bereits mehrfach beschrieben wurde (Bierne et al., 2005; Shi et al., 2005). Es wurde z.B. gezeigt, dass die Invasion von *Salmonella typhimurium* in die basolaterale Plasmamembran von polarisierten Epithelzellen weder Rac noch Cdc42 benötigt. Die Aufnahme über die apikale Membran hingegen ist von Rac, nicht aber von Cdc42 abhängig, was im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Experimenten mit nicht polarisierten Zellen steht (Criss et al., 2001). Hierbei wurden für die ausgeführten

Experimente allerdings wieder dominant-negative Formen der Rho-GTPasen verwendet, so dass diese Ergebnisse optimalerweise mit ‚knockout‘ oder RNAi Zellen verifiziert werden sollten.

Die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella typhimurium* in fibroblastoide Zellen ist also unabhängig von Cdc42-Signalwegen. Somit entfällt auch die Möglichkeit, dass Rac nach Aktivierung durch Cdc42 die für die Salmonellen-Invasion nötige Aktinreorganisation vermittelt. Nichtsdestotrotz könnte Rac aber eine Rolle für die SopB-induzierte Aufnahme spielen. Rac kann durch die ‚upstream‘ liegende Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) aktiviert werden. Die PI3-K leitet von Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgehende Signale weiter (Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999) und führt zur Aktivierung der GTPase Ras (Rodriguez-Viciano et al., 1997). Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), das Produkt der PI3-K, reguliert eine Anzahl Rac-spezifischer GEFs wie z.B. Vav und Tiam-1 und induziert dadurch die Aktivierung von Rac (Han et al., 1998; Nimnual et al., 1998). Außerdem wurde beobachtet, dass Abi1 PI3-K in einen multimolekularen Komplex mit Eps8 und Sos-1 rekrutieren kann, der Rac-GEF-Aktivität aufweist (Innocenti et al., 2003). In Hinsicht auf die Invasion von *Salmonella typhimurium* wurde gezeigt, dass die Phosphoinositide PIP₂ und PIP₃ in durch *Salmonella*-induzierten ‚membrane ruffles‘ angereichert sind (Steele-Mortimer et al., 2000; Terebiznik et al., 2002). Ob die PI3-K hierbei eine übergeordnete Rolle spielt, ist unklar. Zwar wurde demonstriert, dass der bakterielle Effektor SopB die Phosphorylierung und Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt induzieren kann und dass dies abhängig von einer Aktivierung der PI3-K ist (Steele-Mortimer et al., 2000), aber es wurde auch beobachtet, dass die Inhibierung der PI3-K durch z.B. Wortmannin keinen negativen Effekt auf die Invasionsfähigkeit von *Salmonella typhimurium* hatte (Steele-Mortimer et al., 2002). Auch wird vermutet, dass die Aktivierung der PI3-K nicht direkt über SopB vermittelt wird, da durch Immunpräzipitationen mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper die aktivierte PI3-K sowohl nach Infektion mit Wildtyp-Salmonellen als auch mit Δ sopB-Salmonellen nachgewiesen werden konnte (Steele-Mortimer et al., 2000). Die Rolle der PI3-K für die Invasion von *Salmonella typhimurium* ist also noch nicht vollständig geklärt bzw. kontrovers.

Um auszuschließen zu können, dass die SopB-induzierte Invasion von *Salmonella* doch über den Rac-Signalweg, der möglicherweise durch die PI3-K aktiviert wird, vermittelt wird, wurden in der vorliegenden Arbeit Nap1 RNAi Zellen, in denen die Signalübertragung von Rac an das Aktinzytoskelett defekt ist, im Zusammenhang mit Δ sopE/E2-*Salmonella* untersucht. Als Kontrollen wurden Mock RNAi Zellen sowie Wildtyp- und

invasionsdefiziente Δ sopB/E/E2-Salmonellen verwendet. Die Aufnahme von Δ sopE/E2-Salmonellen in Nap1 RNAi Zellen entsprach der Invasion in Mock RNAi Kontrollzellen (s. Abb. 3.31). Also ist die SopB-vermittelte Invasion von *Salmonella typhimurium* unabhängig von Rac/WAVE-Komplex-vermittelter Aktinreorganisation.

In der vorliegenden Arbeit wurde also gezeigt, dass sowohl die allgemeine Invasion als auch die SopB-vermittelte Aufnahme von *Salmonella typhimurium* unabhängig von Cdc42- und Rac-vermittelten Signalwegen ist.

Es besteht die Möglichkeit, dass die beiden GTPasen redundante Funktionen bei der Salmonellen-Invasion übernehmen, denn in den verwendeten Cdc42^{-/-} Zellen bzw. Nap1 RNAi Zellen ist noch der jeweils andere Rho-GTPase-Signalweg intakt. Eine Interferenz mit beiden Signalwegen zugleich und anschließende Infektionsexperimente mit diversen Sop-Mutanten von *Salmonella typhimurium* könnte diese Fragestellung möglicherweise beantworten. Außerdem ist es denkbar, dass die SopB-vermittelte Invasion komplett über andere Signalwege vermittelt wird. Vorstellbar wäre eine Involvierung anderer Rho-GTPasen. Für polarisierte Epithelzellen wurde gezeigt, dass Rac und Cdc42 zwar eine Rolle in der Invasion von *Salmonella typhimurium* spielen, dass aber keine der GTPasen eine essentielle Funktion übernimmt. Durch die Behandlung der infizierten Epithelzellen mit Toxin B, das Rho-GTPasen durch Glykosylierung eines Threoninrests in der GTP-Bindetasche inaktiviert, konnte die Invasionseffizienz von *Salmonella* auf ca. 20% reduziert werden (Criss et al., 2001; Criss und Casanova, 2003). Also lässt sich vermuten, dass Rho-GTPasen für die Invasion des Pathogens in polarisierte Epithelzellen eine Rolle spielen. Da Toxin B ein unspezifischer Inhibitor ist und mittlerweile über 20 Mitglieder der Rho-GTPase-Familie beschrieben sind, lässt sich aber keine Aussage darüber machen, welche Rho-GTPase(n) für den Invasionsmechanismus von Bedeutung ist/sind. Die Inaktivierung durch spezifische Inhibitoren oder durch genetische Deletion von einzelnen oder mehreren Rho-GTPasen wäre also zum besseren Verständnis der Pathogenität von *Salmonella typhimurium* von Vorteil.

4.11 Cdc42 wird nicht für die SopE2-induzierte Formation von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ benötigt

Die bakteriellen Effektorproteine SopE und SopE2 aus *Salmonella typhimurium* sind *in vitro* effiziente Guanin-Austauschfaktoren (GEFs) für Rac und Cdc42, wie durch biochemische Analysen demonstriert wurde (Hardt et al., 1998; Stender et al., 2000). Obwohl SopE und SopE2 zu 69% identisch zueinander sind, weist SopE2 eine Präferenz für Cdc42 auf, während

SopE beide GTPasen gleichermaßen aktivieren kann (Friebe et al., 2001). Die Struktur von SopE im Komplex mit Cdc42 wurde bereits aufgelöst. Es wurde gezeigt, dass die Struktur von SopE sich von eukaryotischen GEFs wie z.B. Tiam1 völlig unterscheidet. Nichtsdestotrotz binden sie dieselbe Stelle der GTPase und lösen so dieselbe Konformationsänderung aus, die den GDP-GTP-Austausch an der GTPase induziert (Buchwald et al., 2002; Schlumberger et al., 2003). Die Auflösung der Struktur der katalytischen Domäne von SopE2 erbrachte ähnliche Ergebnisse und unterstützt die Annahme, dass die bakteriellen GEFs SopE und SopE2 trotz komplett divergenter Sequenz zu eukaryotischen GEFs den Guanin-Austausch auf ähnliche Art und Weise induzieren (Williams et al., 2004).

Transfektionsexperimente von kultivierten Zellen mit Expressionsvektoren für SopE und SopE2 zeigten, dass beide Proteine prominente Aktinreorganisation in Form von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ induzieren und die Aufnahme nicht-invasiver Salmonellen begünstigen können (Hardt et al., 1998; Stender et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde aber gezeigt, dass Cdc42 für die Invasion von *Salmonella typhimurium* keine wesentliche Rolle spielt und dass die SopB-vermittelte Invasion des Pathogens in Cdc42^{-/-} Zellen der in Cdc42-exprimierenden Vorläuferzellen entspricht (s. Kapitel 3.2.9, Abb. 3.30). Um die Substratspezifität von SopE und SopE2 zu untersuchen, wurden Cdc42^{+/-} und Cdc42^{-/-} Zellen mit entsprechenden M45-Fusionskonstrukten transfiziert und mittels indirekter Immunfluoreszenz auf die Ausbildung von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘ untersucht. Falls SopE2 tatsächlich spezifisch für Cdc42 ist, sollte es keinen Effekt in Cdc42-defizienten Zellen zeigen. SopE kann neben Cdc42 auch Rac aktivieren und sollte somit Aktinreorganisation in Cdc42^{-/-} Zellen auslösen können, da die Zellen Rac noch exprimieren. Es zeigte sich, dass die Expression von SopE in sowohl Cdc42^{+/-} als auch Cdc42^{-/-} Zellen die Bildung von Lamellipodien und ‚ruffles‘ induzierte (s. Abb. 3.32). Dasselbe wurde überraschenderweise jedoch auch für SopE2 beobachtet (s. Abb. 3.33). Eine Quantifizierung dieser zellulären Reaktion auf die Expression von SopE und SopE2 zeigte, dass Cdc42^{-/-} Zellen nahezu in gleichem Maße auf die Expression von SopE und SopE2 mit der Formation von Lamellipodien und ‚ruffles‘ antworteten wie die Cdc42^{+/-} Zellen. Die Substratspezifität von SopE2 für Cdc42 kann hiermit also in Frage gestellt werden. SopE2 muss neben Cdc42 folglich einen oder mehrere weitere Interaktionspartner der Wirtszelle haben, die eine derartige Umstrukturierung des Zytoskeletts induzieren können.

Welche anderen GTPasen der Wirtszelle (neben Rac und Cdc42) möglicherweise noch von SopE und SopE2 *in vivo* manipuliert werden können, ist unklar. Konstitutiv-aktive Mutanten von TC-10, TCL (TC10-like), Rac2, Rac3 und RhoG, die den Cdc42- und Rac-Unterklassen der Rho-GTPasen zugeordnet werden, lösen nach Transfektion in Zellkulturzellen die Formation von Lamellipodien und die Bündelung von Aktinfilamenten aus (Aspenstrom et al., 2004). Es besteht also die Möglichkeit, dass die durch SopE und SopE2 induzierte Aktinreorganisation über eine oder mehrere dieser Rho-GTPasen vermittelt wird. Ein besonders interessanter Kandidat ist die Rho-GTPase TC-10, da sie Cdc42 sehr ähnlich ist und wie dieses ubiquitär exprimiert wird (Murphy et al., 1999; Neudauer et al., 1998).

Für SopE wurde postuliert, dass es Rab-GTPasen, die in den Vesikeltransport involviert sind, aktivieren kann (Mukherjee et al., 2001). SopE2 wurde in Hinsicht auf eine GEF-Aktivität für die GTPase Ha-Ras analysiert, es zeigte sich aber, dass Ha-Ras nicht durch SopE2 aktiviert werden kann (Stender et al., 2000).

Die postulierten Interaktionen der bakteriellen Effektorproteine SopE, SopE2 und SopB aus *Salmonella typhimurium* mit den Rho-GTPasen Rac und Cdc42 sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Signalwege sind mit den Ziffern 1-3 gekennzeichnet und werden im Folgenden kurz beschrieben:

- 1) SopE2 induziert Aktinreorganisation in Cdc42-defizienten Zellen. Daher wird angenommen, dass SopE2 und eventuell auch SopE neben Cdc42 weitere GTPasen aktivieren können (s. Kapitel 3.2.10 und 4.11).
- 2) Die SopB-induzierte Aufnahme von *Salmonella typhimurium* ist weder von Rac/WAVE-Komplex-vermittelter noch von Cdc42- und N-WASP-vermittelter Aktinreorganisation abhängig (s. Kapitel 3.2.9 und 4.10).
- 3) Ob Rac selbst für die Invasion von *Salmonella* eine wichtige Funktion hat, kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden. Jedoch ist der bisher einzige bekannte Signalweg von Rac zur Aktinpolymerisation –nämlich über den WAVE-Komplex- nicht essentiell für die Invasion von *Salmonella typhimurium*.

Welche anderen Signalwege hinsichtlich der Aktinreorganisation (rote Pfeile) durch die bakteriellen Effektoren induziert werden, bleibt also näher zu untersuchen.

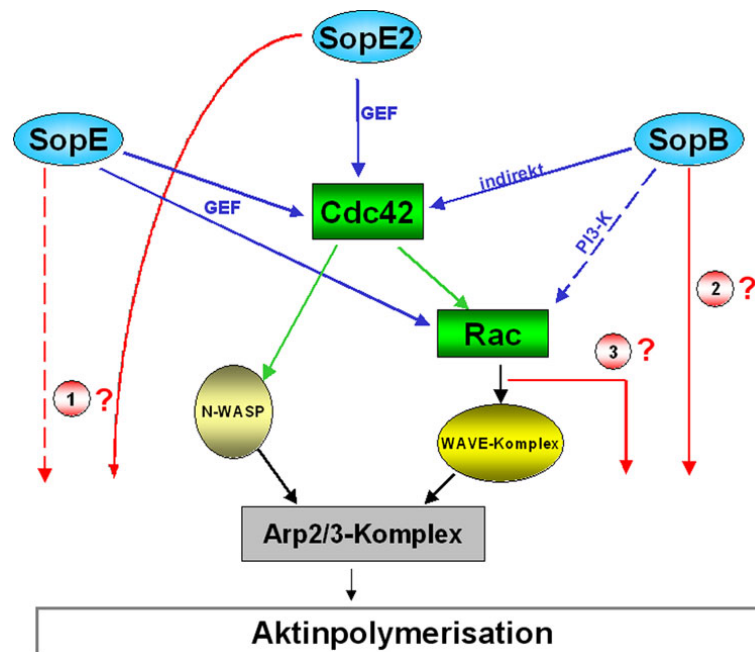


Abbildung 4.1: Hypothetische Signalwege von den bakteriellen Effektoren SopE, SopE2 und SopB aus *Salmonella typhimurium* zur Aktinpolymerisation der Wirtszelle. Die postulierten Interaktionen der bakteriellen Effektoren mit den Rho-GTPasen sind durch blaue Pfeile dargestellt. Die grünen und schwarzen Pfeile verweisen auf die Interaktion der GTPasen und ihre Verbindung zur Aktinreorganisation. Die roten Pfeile stellen mögliche, aber bisher unbekannte Signalwege dar. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Signalwege sind mit den Ziffern 1-3 gekennzeichnet (Sop = ‚*Salmonella* outer protein‘; PI3-K = Phosphatidylinositol 3-Kinase; GEF = ‚Guanin nucleotide exchange factor‘).

5 Zusammenfassung

Gerichtete Aktinpolymerisation ist für eine Vielzahl zellulärer Prozesse unerlässlich. Die Formation von Aktin-reichen Zellfortsätzen wie z.B. Lamellipodien und Filopodien wird hauptsächlich von den Rho-GTPasen Rac und Cdc42 stimuliert. Die Signalweiterleitung von den GTPasen zu dem Aktin-nukleierenden Arp2/3-Komplex wird über Proteine der WASP/WAVE-Familie vermittelt. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass WAVE1, WAVE2 und WAVE3 an der lamellipodialen Spitze motiler Zellen lokalisieren. Durch die spezifischen Antikörper wurde zudem demonstriert, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien lediglich WAVE2 exprimieren. WAVE2 agiert ‚downstream‘ von Rac, kann diese GTPase aber nicht direkt binden. Hierfür benötigt es weitere Proteine (Sra-1, Nap1, Abi1), die sich in einem multimolekularen Komplex zusammenfügen. Dieser WAVE-Komplex vermittelt die Rac-abhängige Formation von Lamellipodien und ‚membrane ruffles‘. Die Verbindung von Rac und WAVE2 kann aber auch durch das Insulin-Rezeptorsubstrat p53 (IRSp53) moduliert werden. Es weist diverse Domänen auf, über die es mit Cdc42, Rac, WAVE2 und anderen regulatorischen Komponenten der Aktinpolymerisationsmaschinerie interagieren kann. Aufgrund von Datenbankrecherchen wurden mehrere Proteine mit starker Sequenzhomologie zu IRSp53 entdeckt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass zwei dieser IRSp53-verwandten Proteine (IRTKS und FLJ22582) ebenfalls an der lamellipodialen Spitze lokalisieren und dass IRTKS ebenso wie IRSp53 mit Cdc42 und Rac interagiert. Diese Ergebnisse lassen auf eine regulatorische Funktion dieser Proteine in der Vermittlung der durch Cdc42 und Rac induzierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts schließen.

Die gerichtete Aktinpolymerisation wird von einer Vielzahl bakterieller Pathogene zum Zwecke ihrer Internalisierung ausgenutzt. Sie manipulieren Komponenten der Aktinpolymerisationsmaschinerie wie z.B. Cdc42 und Rac, um über eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts in die Wirtszelle aufgenommen zu werden. Hier wurde gezeigt, dass die InlB-induzierte Invasion von *Listeria monocytogenes* abhängig von WAVE-Komplex-vermittelter Aktinreorganisation ist. Im Gegensatz dazu ist die Aufnahme von *Shigella flexneri* unabhängig vom WAVE-Komplex. Auch N-WASP spielt für die Invasion von *Shigella* keine Rolle. Außerdem wurde gezeigt, dass die Aufnahme von *Salmonella typhimurium* und insbesondere die über den bakteriellen Effektor SopB induzierte Invasion des Pathogens jeweils unabhängig von Rac- und Cdc42-‚Signalling‘ erfolgen kann. Dies lässt vermuten, dass die Invasion dieses Pathogens entgegen bisheriger Annahmen auch oder sogar ausschließlich über andere Signalwege vermittelt wird.

6 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M., Heaysman, J.E. and Pegrum, S.M. (1970a) The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res*, **59**, 393-398.
- Abercrombie, M., Heaysman, J.E. and Pegrum, S.M. (1970b) The locomotion of fibroblasts in culture. II. "RRuffling". *Exp Cell Res*, **60**, 437-444.
- Abercrombie, M., Heaysman, J.E. and Pegrum, S.M. (1971) The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res*, **67**, 359-367.
- Adam, T., Giry, M., Boquet, P. and Sansonetti, P. (1996) Rho-dependent membrane folding causes Shigella entry into epithelial cells. *Embo J*, **15**, 3315-3321.
- Alto, N.M., Shao, F., Lazar, C.S., Brost, R.L., Chua, G., Mattoo, S., McMahon, S.A., Ghosh, P., Hughes, T.R., Boone, C. and Dixon, J.E. (2006) Identification of a Bacterial Type III Effector Family with G Protein Mimicry Functions. *Cell*, **124**, 133-145.
- Amann, K.J. and Pollard, T.D. (2001) The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol*, **3**, 306-310.
- Aspenstrom, P., Fransson, A. and Saras, J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*, **377**, 327-337.
- Bartles, J.R. (2000) Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 72-78.
- Baum, B. and Kunda, P. (2005) Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own. *Curr Biol*, **15**, R305-308.
- Baumeister, M.A., Martinu, L., Rossman, K.L., Sondek, J., Lemmon, M.A. and Chou, M.M. (2003) Loss of phosphatidylinositol 3-phosphate binding by the C-terminal Tiam-1 pleckstrin homology domain prevents in vivo Rac1 activation without affecting membrane targeting. *J Biol Chem*, **278**, 11457-11464.
- Bear, J.E., Rawls, J.F. and Saxe, C.L., 3rd. (1998) SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol*, **142**, 1325-1335.
- Benesch, S., Lommel, S., Steffen, A., Stradal, T.E., Scaplehorn, N., Way, M., Wehland, J. and Rottner, K. (2002) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem*, **277**, 37771-37776.
- Benesch, S., Polo, S., Lai, F.P., Anderson, K.I., Stradal, T.E., Wehland, J. and Rottner, K. (2005) N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, **118**, 3103-3115.
- Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H.L. and Cossart, P. (2001) A role for cofilin and LIM kinase in Listeria-induced phagocytosis. *J Cell Biol*, **155**, 101-112.
- Bierne, H., Miki, H., Innocenti, M., Scita, G., Gertler, F.B., Takenawa, T. and Cossart, P. (2005) WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for Listeria invasion induced by the Met receptor. *J Cell Sci*, **118**, 1537-1547.
- Bishop, A.L. and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, **348 Pt 2**, 241-255.
- Blagg, S.L., Stewart, M., Sambles, C. and Insall, R.H. (2003) PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in Dictyostelium. *Curr Biol*, **13**, 1480-1487.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A. and Pollard, T.D. (2000a) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature*, **404**, 1007-1011.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D. and Mullins, R.D. (2000b) Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol*, **10**, 1273-1282.

- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. and Sansonetti, P. (1999) The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol*, **147**, 683-693.
- Bougneres, L., Girardin, S.E., Weed, S.A., Karginov, A.V., Olivo-Marin, J.C., Parsons, J.T., Sansonetti, P.J. and Van Nhieu, G.T. (2004) Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *J Cell Biol*, **166**, 225-235.
- Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (2001) *Listeria* protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry*, **40**, 11390-11404.
- Bourdet-Sicard, R., Egile, C., Sansonetti, P.J. and Tran Van Nhieu, G. (2000) Diversion of cytoskeletal processes by *Shigella* during invasion of epithelial cells. *Microbes Infect*, **2**, 813-819.
- Bourdet-Sicard, R., Rudiger, M., Jockusch, B.M., Gounon, P., Sansonetti, P.J. and Nhieu, G.T. (1999) Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *Embo J*, **18**, 5853-5862.
- Buchwald, G., Friebel, A., Galan, J.E., Hardt, W.D., Wittinghofer, A. and Scheffzek, K. (2002) Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *Embo J*, **21**, 3286-3295.
- Burton, E.A., Plattner, R. and Pendergast, A.M. (2003) Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*. *Embo J*, **22**, 5471-5479.
- Carlier, M.F., Jean, C., Rieger, K.J., Lenfant, M. and Pantaloni, D. (1993) Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5034-5038.
- Carlier, M.F., Le Clainche, C., Wiesner, S. and Pantaloni, D. (2003) Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays*, **25**, 336-345.
- Carlier, M.F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P. and Pantaloni, D. (2000) GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem*, **275**, 21946-21952.
- Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (1997) Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol*, **269**, 459-467.
- Chen, L.M., Hobbie, S. and Galan, J.E. (1996) Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science*, **274**, 2115-2118.
- Connolly, B.A., Rice, J., Feig, L.A. and Buchsbaum, R.J. (2005) Tiam1-IRSp53 Complex Formation Directs Specificity of Rac-Mediated Actin Cytoskeleton Regulation. *Mol Cell Biol*, **25**, 4602-4614.
- Coombes, B.K. and Finlay, B.B. (2005) Insertion of the bacterial type III translocon: not your average needle stick. *Trends Microbiol*, **13**, 92-95.
- Cooper, J.A., Buhle, E.L., Jr., Walker, S.B., Tsong, T.Y. and Pollard, T.D. (1983) Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry*, **22**, 2193-2202.
- Cooper, J.A. and Schafer, D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 97-103.
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J. and Lecuit, M. (2003) Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol*, **13**, 23-31.

- Cossart, P. and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, **304**, 242-248.
- Criss, A.K., Ahlgren, D.M., Jou, T.S., McCormick, B.A. and Casanova, J.E. (2001) The GTPase Rac1 selectively regulates Salmonella invasion at the apical plasma membrane of polarized epithelial cells. *J Cell Sci*, **114**, 1331-1341.
- Criss, A.K. and Casanova, J.E. (2003) Coordinate regulation of Salmonella enterica serovar Typhimurium invasion of epithelial cells by the Arp2/3 complex and Rho GTPases. *Infect Immun*, **71**, 2885-2891.
- Czuchra, A., Wu, X., Meyer, H., van Hengel, J., Schroeder, T., Geffers, R., Rottner, K. and Brakebusch, C. (2005) Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell*, **16**, 4473-4484.
- da Costa, S.R., Okamoto, C.T. and Hamm-Alvarez, S.F. (2003) Actin microfilaments et al.-- the many components, effectors and regulators of epithelial cell endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 1359-1383.
- Dahl, J.P., Wang-Dunlop, J., Gonzales, C., Goad, M.E., Mark, R.J. and Kwak, S.P. (2003) Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J Neurosci*, **23**, 3343-3352.
- Dayel, M.J. and Mullins, R.D. (2004) Activation of Arp2/3 Complex: Addition of the First Subunit of the New Filament by a WASP Protein Triggers Rapid ATP Hydrolysis on Arp2. *PLoS Biol*, **2**, E91.
- Dehio, C., Prevost, M.C. and Sansonetti, P.J. (1995) Invasion of epithelial cells by Shigella flexneri induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *Embo J*, **14**, 2471-2482.
- Derry, J.M., Ochs, H.D. and Francke, U. (1994) Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, **79**, following 922.
- Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K. and Scita, G. (2005) Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 955-970.
- Dong, Y., Pruyne, D. and Bretscher, A. (2003) Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol*, **161**, 1081-1092.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. and Nosworthy, N.J. (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, **83**, 433-473.
- Drams, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. and Cossart, P. (1995) Entry of Listeria monocytogenes into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol*, **16**, 251-261.
- Dumenil, G., Sansonetti, P. and Tran Van Nhieu, G. (2000) Src tyrosine kinase activity down-regulates Rho-dependent responses during Shigella entry into epithelial cells and stress fibre formation. *J Cell Sci*, **113** (Pt 1), 71-80.
- DuPont, H.L., Levine, M.M., Hornick, R.B. and Formal, S.B. (1989) Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis*, **159**, 1126-1128.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. and Kirschner, M.W. (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, **418**, 790-793.
- Egile, C., Rouiller, I., Xu, X.P., Volkmann, N., Li, R. and Hanein, D. (2005) Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions. *PLoS Biol*, **3**, e383.

- Ehrbar, K., Mirolid, S., Friebel, A., Stender, S. and Hardt, W.D. (2002) Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Int J Med Microbiol*, **291**, 479-485.
- Elsinghorst, E.A. (1994) Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol*, **236**, 405-420.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-635.
- Faix, J. and Rottner, K. (2005) The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*.
- Finlay, B.B., Ruschkowski, S. and Dedhar, S. (1991) Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. *J Cell Sci*, **99 (Pt 2)**, 283-296.
- Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W. and Hardt, W.D. (2001) SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem*, **276**, 34035-34040.
- Frieden, C. (1983) Polymerization of actin: mechanism of the Mg²⁺-induced process at pH 8 and 20 degrees C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 6513-6517.
- Fu, Y. and Galan, J.E. (1999) A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, **401**, 293-297.
- Fujiwara, T., Mammoto, A., Kim, Y. and Takai, Y. (2000) Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 626-629.
- Fukuoka, M., Miki, H. and Takenawa, T. (1997) Identification of N-WASP homologs in human and rat brain. *Gene*, **196**, 43-48.
- Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T. and Takenawa, T. (2001) A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol*, **152**, 471-482.
- Funato, Y., Terabayashi, T., Suenaga, N., Seiki, M., Takenawa, T. and Miki, H. (2004) IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res*, **64**, 5237-5244.
- Gasteier, J.E., Madrid, R., Krautkramer, E., Schroder, S., Muranyi, W., Benichou, S. and Fackler, O.T. (2003) Activation of the Rac-binding partner FHOD1 induces actin stress fibers via a ROCK-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **278**, 38902-38912.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Furman, M.I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V.T. and Pollard, T.D. (1992) The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell*, **3**, 1015-1024.
- Gouin, E., Egile, C., Dehoux, P., Villiers, V., Adams, J., Gertler, F., Li, R. and Cossart, P. (2004) The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature*, **427**, 457-461.
- Gournier, H., Goley, E.D., Niederstrasser, H., Trinh, T. and Welch, M.D. (2001) Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Mol Cell*, **8**, 1041-1052.
- Govind, S., Kozma, R., Monfries, C., Lim, L. and Ahmed, S. (2001) Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J Cell Biol*, **152**, 579-594.
- Gruenheid, S. and Finlay, B.B. (2003) Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, **422**, 775-781.
- Hahne, P., Sechi, A., Benesch, S. and Small, J.V. (2001) Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett*, **492**, 215-220.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A. and Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase

- in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*, **279**, 558-560.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. and Galan, J.E. (1998) S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*, **93**, 815-826.
- Harrington, A.T., Hearn, P.D., Picking, W.L., Barker, J.R., Wessel, A. and Picking, W.D. (2003) Structural characterization of the N terminus of IpaC from *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, **71**, 1255-1264.
- Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M. and et al. (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol*, **5**, 393-403.
- Hayward, R.D. and Koronakis, V. (1999) Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *Embo J*, **18**, 4926-4934.
- Hertzog, M., van Heijenoort, C., Didry, D., Gaudier, M., Coutant, J., Gigant, B., Didelot, G., Preat, T., Knossow, M., Guittet, E. and Carlier, M.F. (2004) The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell*, **117**, 611-623.
- Herzog, M., Draeger, A., Ehler, E. and Small, J. (1994) Immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton: double and triple immunofluorescence. In *Cell biology: a laboratory handbook*. Academic press, New York, pp. 355-360.
- Higashide, W., Dai, S., Hombs, V.P. and Zhou, D. (2002) Involvement of SipA in modulating actin dynamics during *Salmonella* invasion into cultured epithelial cells. *Cell Microbiol*, **4**, 357-365.
- Higgs, H.N. (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci*, **30**, 342-353.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2000) Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, **150**, 1311-1320.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*, **70**, 649-676.
- Ho, H.Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., Le, M., Li, J., Gygi, S.P. and Kirschner, M.W. (2004) Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell*, **118**, 203-216.
- Ho, H.Y., Rohatgi, R., Ma, L. and Kirschner, M.W. (2001) CR16 forms a complex with N-WASP in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11306-11311.
- Imai, K., Nonoyama, S. and Ochs, H.D. (2003) WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **3**, 427-436.
- Innocenti, M., Frittoli, E., Ponzanelli, I., Falck, J.R., Brachmann, S.M., Di Fiore, P.P. and Scita, G. (2003) Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol*, **160**, 17-23.
- Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F.P., Hertzog, M., Stradal, T.E., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A., Benesch, S., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F. and Scita, G. (2005) Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat Cell Biol*, **7**, 969-976.
- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F. and Scita, G. (2004) Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol*, **6**, 319-327.

- Ireton, K., Payraastre, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M. and Cossart, P. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science*, **274**, 780-782.
- Ireton, K., Payraastre, B. and Cossart, P. (1999) The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, **274**, 17025-17032.
- Isberg, R.R. and Van Nhieu, G.T. (1994) Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*, **28**, 395-422.
- Izzard, C.S. and Lochner, L.R. (1976) Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci*, **21**, 129-159.
- Izzard, C.S. and Lochner, L.R. (1980) Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. *J Cell Sci*, **42**, 81-116.
- Jaffe, A.B. and Hall, A. (2005) RHO GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Jennison, A.V. and Verma, N.K. (2004) *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev*, **28**, 43-58.
- Jepson, M.A., Kenny, B. and Leard, A.D. (2001) Role of sipA in the early stages of *Salmonella typhimurium* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol*, **3**, 417-426.
- Jonquieres, R., Bierre, H., Fiedler, F., Gounon, P. and Cossart, P. (1999) Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, **34**, 902-914.
- Jonquieres, R., Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P. (2001) Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, **42**, 955-965.
- Kato, M., Miki, H., Kurita, S., Endo, T., Nakagawa, H., Miyamoto, S. and Takenawa, T. (2002) WICH, a novel verprolin homology domain-containing protein that functions cooperatively with N-WASP in actin-microspike formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 41-47.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J.V. (2002) Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 746-761.
- Kelleher, J.F., Atkinson, S.J. and Pollard, T.D. (1995) Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*, **131**, 385-397.
- Kelley, L.A., MacCallum, R.M. and Sternberg, M.J. (2000) Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol*, **299**, 499-520.
- Kerkhoff, E., Simpson, J.C., Leberfinger, C.B., Otto, I.M., Doerks, T., Bork, P., Rapp, U.R., Raabe, T. and Pepperkok, R. (2001) The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol*, **11**, 1963-1968.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A. and Rosen, M.K. (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, **404**, 151-158.
- Korn, E.D., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, **238**, 638-644.
- Kovacs, E.M., Ali, R.G., McCormack, A.J. and Yap, A.S. (2002a) E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem*, **277**, 6708-6718.
- Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Paterson, A.D. and Yap, A.S. (2002b) Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol*, **12**, 379-382.
- Kowalski, J.R., Egile, C., Gil, S., Snapper, S.B., Li, R. and Thomas, S.M. (2005) Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J Cell Sci*, **118**, 79-87.

- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **15**, 1942-1952.
- Kreishman-Deitrick, M. and Rosen, M.K. (2002) Ignition of a cellular machine. *Nat Cell Biol*, **4**, E31-33.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J. and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol*, **11**, 1645-1655.
- Kubori, T. and Galan, J.E. (2003) Temporal regulation of salmonella virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell*, **115**, 333-342.
- Kueltzo, L.A., Osiecki, J., Barker, J., Picking, W.L., Ersoy, B., Picking, W.D. and Middaugh, C.R. (2003) Structure-function analysis of invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. *J Biol Chem*, **278**, 2792-2798.
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V. and Baum, B. (2003) Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol*, **13**, 1867-1875.
- Kwiatkowski, D.J. (1999) Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 103-108.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359-369.
- Lecuit, M., Hurme, R., Pizarro-Cerda, J., Ohayon, H., Geiger, B. and Cossart, P. (2000) A role for alpha-and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10008-10013.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J. and Cossart, P. (1997) Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun*, **65**, 5309-5319.
- Leng, Y., Zhang, J., Badour, K., Arpaia, E., Freeman, S., Cheung, P., Siu, M. and Siminovitch, K. (2005) Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Li, F. and Higgs, H.N. (2003) The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol*, **13**, 1335-1340.
- Lommel, S., Benesch, S., Rohde, M., Wehland, J. and Rottner, K. (2004) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol*, **6**, 243-254.
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J. and Kuhn, R. (2001) Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep*, **2**, 850-857.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. and Pollard, T.D. (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, **127**, 107-115.
- Machesky, L.M. and Insall, R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, **8**, 1347-1356.
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E. and Pollard, T.D. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3739-3744.
- Mallavarapu, A. and Mitchison, T. (1999) Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol*, **146**, 1097-1106.

- Marchand, J.B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D. and Higgs, H.N. (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol*, **3**, 76-82.
- McGhie, E.J., Hayward, R.D. and Koronakis, V. (2001) Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *Embo J*, **20**, 2131-2139.
- McGhie, E.J., Hayward, R.D. and Koronakis, V. (2004) Control of actin turnover by a salmonella invasion protein. *Mol Cell*, **13**, 497-510.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M. and Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, **84**, 923-932.
- Mies, B., Rottner, K. and Small, J. (1998) Multiple immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton. In JE, C. (ed.), *Cell biology: a laboratory handbook*. Academic press, New York, pp. 469-476.
- Miki, H., Miura, K. and Takenawa, T. (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo J*, **15**, 5326-5335.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. and Takenawa, T. (1998a) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, **391**, 93-96.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (1998b) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*, **17**, 6932-6941.
- Miki, H. and Takenawa, T. (2002) WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 93-99.
- Miki, H. and Takenawa, T. (2003) Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem (Tokyo)*, **134**, 309-313.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, **408**, 732-735.
- Miold, S., Ehrbar, K., Weissmuller, A., Prager, R., Tschape, H., Russmann, H. and Hardt, W.D. (2001) *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2. *J Bacteriol*, **183**, 2348-2358.
- Miura, K., Miki, H., Shimazaki, K., Kawai, N. and Takenawa, T. (1996) Interaction of Ash/Grb-2 via its SH3 domains with neuron-specific p150 and p65. *Biochem J*, **316** (Pt 2), 639-645.
- Mukherjee, K., Parashuraman, S., Raje, M. and Mukhopadhyay, A. (2001) SopE acts as an Rab5-specific nucleotide exchange factor and recruits non-prenylated Rab5 on *Salmonella*-containing phagosomes to promote fusion with early endosomes. *J Biol Chem*, **276**, 23607-23615.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6181-6186.
- Mullins, R.D., Stafford, W.F. and Pollard, T.D. (1997) Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*, **136**, 331-343.
- Murphy, G.A., Solski, P.A., Jillian, S.A., Perez de la Ossa, P., D'Eustachio, P., Der, C.J. and Rush, M.G. (1999) Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene*, **18**, 3831-3845.
- Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T. and Miyamoto, S. (2001) N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J Cell Sci*, **114**, 1555-1565.

- Neudauer, C.L., Joberty, G., Tatsis, N. and Macara, I.G. (1998) Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol*, **8**, 1151-1160.
- Nhieu, G.T., Enninga, J., Sansonetti, P. and Grompone, G. (2005) Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating Shigella invasion. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 16-20.
- Nhieu, G.T. and Sansonetti, P.J. (1999) Mechanism of Shigella entry into epithelial cells. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 51-55.
- Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D.J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M.P., Parsot, C., Sansonetti, P.J. and Payrastre, B. (2002) Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *Embo J*, **21**, 5069-5078.
- Nimnual, A.S., Yatsula, B.A. and Bar-Sagi, D. (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*, **279**, 560-563.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53-62.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, **144**, 1235-1244.
- Nozumi, M., Nakagawa, H., Miki, H., Takenawa, T. and Miyamoto, S. (2003) Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J Cell Sci*, **116**, 239-246.
- Ochs, H.D., Slichter, S.J., Harker, L.A., Von Behrens, W.E., Clark, R.A. and Wedgwood, R.J. (1980) The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood*, **55**, 243-252.
- Oda, K., Shiratsuchi, T., Nishimori, H., Inazawa, J., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Nakamura, Y. and Tokino, T. (1999) Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1. *Cytogenet Cell Genet*, **84**, 75-82.
- Ohya, K., Handa, Y., Ogawa, M., Suzuki, M. and Sasakawa, C. (2005) IpgB1 is a novel Shigella effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. *J Biol Chem*, **280**, 24022-24034.
- Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2004) PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol*, **6**, 420-426.
- Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Ohmi, K. and Yamada, M. (1999) Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum Mol Genet*, **8**, 947-957.
- Olofsson, B. (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, **11**, 545-554.
- Olson, M.F. (2003) Dispatch. GTPase signalling: new functions for Diaphanous-related formins. *Curr Biol*, **13**, R360-362.
- Osaki, M., Oshimura, M. and Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 667-676.
- Otto, I.M., Raabe, T., Rennefahrt, U.E., Bork, P., Rapp, U.R. and Kerkhoff, E. (2000) The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol*, **10**, 345-348.
- Paavilainen, V.O., Bertling, E., Falck, S. and Lappalainen, P. (2004) Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol*, **14**, 386-394.

- Panchal, S.C., Kaiser, D.A., Torres, E., Pollard, T.D. and Rosen, M.K. (2003) A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nat Struct Biol*, **10**, 591-598.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P. and Carlier, M.F. (2000) The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol*, **2**, 385-391.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C. and Carlier, M.F. (2001) Mechanism of actin-based motility. *Science*, **292**, 1502-1506.
- Parsons, J.T., Martin, K.H., Slack, J.K., Taylor, J.M. and Weed, S.A. (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*, **19**, 5606-5613.
- Patel, J.C. and Galan, J.E. (2005) Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 10-15.
- Pellegrin, S. and Mellor, H. (2005) The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol*, **15**, 129-133.
- Peng, J., Wallar, B.J., Flanders, A., Swiatek, P.J. and Alberts, A.S. (2003) Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol*, **13**, 534-545.
- Perelroizen, I., Didry, D., Christensen, H., Chua, N.H. and Carlier, M.F. (1996) Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in action assembly. *J Biol Chem*, **271**, 12302-12309.
- Philpott, D.J., Edgeworth, J.D. and Sansonetti, P.J. (2000) The pathogenesis of Shigella flexneri infection: lessons from in vitro and in vivo studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 575-586.
- Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P. (2006) Subversion of cellular functions by Listeria monocytogenes. *J Pathol*, **208**, 215-223.
- Pollard, T.D. (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, **103**, 2747-2754.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 545-576.
- Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**, 453-465.
- Pope, B., Way, M., Matsudaira, P.T. and Weeds, A. (1994) Characterisation of the F-actin binding domains of villin: classification of F-actin binding proteins into two groups according to their binding sites on actin. *FEBS Lett*, **338**, 58-62.
- Portnoy, D.A., Auerbuch, V. and Glomski, I.J. (2002) The cell biology of Listeria monocytogenes infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol*, **158**, 409-414.
- Prehoda, K.E., Scott, J.A., Mullins, R.D. and Lim, W.A. (2000) Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science*, **290**, 801-806.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C. and Zigmond, S.H. (2003) Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry*, **42**, 486-496.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C. (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, **297**, 612-615.
- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E. and Mullins, R.D. (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, **433**, 382-388.
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, **265**, 23-32.

- Ramesh, N., Anton, I.M., Hartwig, J.H. and Geha, R.S. (1997) WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14671-14676.
- Reif, K., Nobes, C.D., Thomas, G., Hall, A. and Cantrell, D.A. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol*, **6**, 1445-1455.
- Ridley, A.J. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.
- Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P. and Antonny, B. (2003) Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem*, **278**, 4756-4762.
- Roberts, A.J. and Wiedmann, M. (2003) Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 904-918.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S. and Pollard, T.D. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, **294**, 1679-1684.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A. and Downward, J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, **89**, 457-467.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y. and Kirschner, M.W. (2000) Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol*, **150**, 1299-1310.
- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W. and Mayer, B.J. (2001) Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem*, **276**, 26448-26452.
- Rottner, K., Lommel, S., Wehland, J. and Stradal, T.E. (2004) Pathogen-induced actin filament rearrangement in infectious diseases. *J Pathol*, **204**, 396-406.
- Rottner, K., Stradal, T.E. and Wehland, J. (2005) Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev Cell*, **9**, 3-17.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A. and Collard, J.G. (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol*, **147**, 1009-1022.
- Schafer, D.A. and Cooper, J.A. (1995) Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 497-518.
- Schlumberger, M.C., Friebe, A., Buchwald, G., Scheffzek, K., Wittinghofer, A. and Hardt, W.D. (2003) Amino acids of the bacterial toxin SopE involved in G nucleotide exchange on Cdc42. *J Biol Chem*, **278**, 27149-27159.
- Schuldt, A. (2005) Spire: a new nucleator for actin. *Nat Cell Biol*, **7**, 107.
- Schuler, H. (2001) ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin. *Biochim Biophys Acta*, **1549**, 137-147.
- Scita, G., Nordstrom, J., Carbone, R., Tenca, P., Giardina, G., Gutkind, S., Bjarnegard, M., Betsholtz, C. and Di Fiore, P.P. (1999) EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature*, **401**, 290-293.
- Scita, G., Tenca, P., Areces, L.B., Tocchetti, A., Frittoli, E., Giardina, G., Ponzanelli, I., Sini, P., Innocenti, M. and Di Fiore, P.P. (2001) An effector region in Eps8 is responsible for the activation of the Rac-specific GEF activity of Sos-1 and for the proper localization of the Rac-based actin-polymerizing machine. *J Cell Biol*, **154**, 1031-1044.

- Selbach, M. and Backert, S. (2005) Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol*, **13**, 181-189.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, **103**, 501-510.
- Shi, J., Scita, G. and Casanova, J.E. (2005) Wave2 signaling mediates invasion of polarized epithelial cells by salmonella typhimurium. *J Biol Chem*.
- Shibata, T., Takeshima, F., Chen, F., Alt, F.W. and Snapper, S.B. (2002) Cdc42 facilitates invasion but not the actin-based motility of *Shigella*. *Curr Biol*, **12**, 341-345.
- Small, J.V. (1988) The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev*, **1**, 155-174.
- Small, J.V., Isenberg, G. and Celis, J.E. (1978) Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature*, **272**, 638-639.
- Small, J.V. and Resch, G.P. (2005) The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 517-523.
- Small, J.V., Rottner, K. and Kaverina, I. (1999) Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 54-60.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E. and Rottner, K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, **12**, 112-120.
- Snapper, S.B., Takeshima, F., Anton, I., Liu, C.H., Thomas, S.M., Nguyen, D., Dudley, D., Fraser, H., Purich, D., Lopez-Ilasaca, M., Klein, C., Davidson, L., Bronson, R., Mulligan, R.C., Southwick, F., Geha, R., Goldberg, M.B., Rosen, F.S., Hartwig, J.H. and Alt, F.W. (2001) N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol*, **3**, 897-904.
- Soderling, S.H., Binns, K.L., Wayman, G.A., Davee, S.M., Ong, S.H., Pawson, T. and Scott, J.D. (2002) The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. *Nat Cell Biol*, **4**, 970-975.
- Sossey-Alaoui, K., Head, K., Nowak, N. and Cowell, J.K. (2003) Genomic organization and expression profile of the human and mouse WAVE gene family. *Mamm Genome*, **14**, 314-322.
- Sousa, S., Cabanes, D., El-Amraoui, A., Petit, C., Lecuit, M. and Cossart, P. (2004) Unconventional myosin VIIa and vezatin, two proteins crucial for *Listeria* entry into epithelial cells. *J Cell Sci*, **117**, 2121-2130.
- Steele-Mortimer, O., Brumell, J.H., Knodler, L.A., Meresse, S., Lopez, A. and Finlay, B.B. (2002) The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol*, **4**, 43-54.
- Steele-Mortimer, O., Knodler, L.A., Marcus, S.L., Scheid, M.P., Goh, B., Pfeifer, C.G., Duronio, V. and Finlay, B.B. (2000) Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector sigD. *J Biol Chem*, **275**, 37718-37724.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J. and Stradal, T.E. (2004) Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *Embo J*, **23**, 749-759.
- Stender, S., Friebe, A., Linder, S., Rohde, M., Mirol, S. and Hardt, W.D. (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol*, **36**, 1206-1221.
- Stovold, C.F., Millard, T.H. and Machesky, L.M. (2005) Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BMC Cell Biol*, **6**, 11.
- Stradal, T.E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M. and Scita, G. (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol*, **14**, 303-311.
- Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J*, **17**, 6516-6526.

- Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 296-302.
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S. and Takenawa, T. (2003) Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell*, **5**, 595-609.
- Svitkina, T.M. and Borisy, G.G. (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, **145**, 1009-1026.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M. and Borisy, G.G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, **160**, 409-421.
- Terebiznik, M.R., Vieira, O.V., Marcus, S.L., Slade, A., Yip, C.M., Trimble, W.S., Meyer, T., Finlay, B.B. and Grinstein, S. (2002) Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella. *Nat Cell Biol*, **4**, 766-773.
- Thomas, E.A., Foye, P.E., Alvarez, C.E., Usui, H. and Sutcliffe, J.G. (2001) Insulin receptor substrate protein p53 localization in rats suggests mechanism for specific polyglutamine neurodegeneration. *Neurosci Lett*, **309**, 145-148.
- Tilney, L.G., Bonder, E.M. and DeRosier, D.J. (1981) Actin filaments elongate from their membrane-associated ends. *J Cell Biol*, **90**, 485-494.
- Tran Van Nhieu, G., Ben-Ze'ev, A. and Sansonetti, P.J. (1997) Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the Shigella IpaA invasin. *Embo J*, **16**, 2717-2729.
- Tran Van Nhieu, G., Bourdet-Sicard, R., Dumenil, G., Blocker, A. and Sansonetti, P.J. (2000) Bacterial signals and cell responses during Shigella entry into epithelial cells. *Cell Microbiol*, **2**, 187-193.
- Tran Van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A. and Sansonetti, P.J. (1999) IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during Shigella entry into epithelial cells. *Embo J*, **18**, 3249-3262.
- Unsworth, K.E., Way, M., McNiven, M., Machesky, L. and Holden, D.W. (2004) Analysis of the mechanisms of Salmonella-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. *Cell Microbiol*, **6**, 1041-1055.
- Urano, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S.C. and Zhan, X. (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*, **3**, 259-266.
- Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M.D. (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*, **253**, 239-254.
- Vazquez-Boland, J.A., Dominguez-Bernal, G., Gonzalez-Zorn, B., Kreft, J. and Goebel, W. (2001a) Pathogenicity islands and virulence evolution in Listeria. *Microbes Infect*, **3**, 571-584.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J. (2001b) Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 584-640.
- Waller, B.J. and Alberts, A.S. (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, **13**, 435-446.
- Weaver, A.M., Heuser, J.E., Karginov, A.V., Lee, W.L., Parsons, J.T. and Cooper, J.A. (2002) Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Curr Biol*, **12**, 1270-1278.

- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T. and Cooper, J.A. (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*, **11**, 370-374.
- Weed, S.A., Karginov, A.V., Schafer, D.A., Weaver, A.M., Kinley, A.W., Cooper, J.A. and Parsons, J.T. (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, **151**, 29-40.
- Wegner, A. (1976) Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, **108**, 139-150.
- Welch, H.C., Coadwell, W.J., Stephens, L.R. and Hawkins, P.T. (2003) Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett*, **546**, 93-97.
- Welch, M.D., DePace, A.H., Verma, S., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. (1997a) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*, **138**, 375-384.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. (1997b) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, **385**, 265-269.
- Welch, M.D. and Mullins, R.D. (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 247-288.
- Westphal, R.S., Soderling, S.H., Alto, N.M., Langeberg, L.K. and Scott, J.D. (2000) Scar/WAVE-1, a Wiskott-Aldrich syndrome protein, assembles an actin-associated multi-kinase scaffold. *Embo J*, **19**, 4589-4600.
- Williams, C., Galyov, E.E. and Bagby, S. (2004) solution structure, backbone dynamics, and interaction with Cdc42 of Salmonella guanine nucleotide exchange factor SopE2. *Biochemistry*, **43**, 11998-12008.
- Wood, W. and Martin, P. (2002) Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 726-730.
- Yamagishi, A., Masuda, M., Ohki, T., Onishi, H. and Mochizuki, N. (2004) A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem*, **279**, 14929-14936.
- Yamaguchi, H., Miki, H., Suetsugu, S., Ma, L., Kirschner, M.W. and Takenawa, T. (2000) Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12631-12636.
- Yamaguchi, H., Miki, H. and Takenawa, T. (2002) Two verprolin homology domains increase the Arp2/3 complex-mediated actin polymerization activities of N-WASP and WAVE1 C-terminal regions. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 214-219.
- Yamazaki, D., Fujiwara, T., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2005) A novel function of WAVE in lamellipodia: WAVE1 is required for stabilization of lamellipodial protrusions during cell spreading. *Genes Cells*, **10**, 381-392.
- Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N. and Takenawa, T. (2003) WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature*, **424**, 452-456.
- Yan, C., Martinez-Quiles, N., Eden, S., Shibata, T., Takeshima, F., Shinkura, R., Fujiwara, Y., Bronson, R., Snapper, S.B., Kirschner, M.W., Geha, R., Rosen, F.S. and Alt, F.W. (2003) WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *Embo J*, **22**, 3602-3612.
- Yang, C., Huang, M., DeBiasio, J., Pring, M., Joyce, M., Miki, H., Takenawa, T. and Zigmond, S.H. (2000) Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J Cell Biol*, **150**, 1001-1012.
- Yarar, D., D'Alessio, J.A., Jeng, R.L. and Welch, M.D. (2002) Motility determinants in WASP family proteins. *Mol Biol Cell*, **13**, 4045-4059.

- Yeh, T.C., Ogawa, W., Danielsen, A.G. and Roth, R.A. (1996) Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **271**, 2921-2928.
- Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T. and Sasakawa, C. (2002) Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *Embo J*, **21**, 2923-2935.
- Yoshida, S. and Sasakawa, C. (2003) Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends Microbiol*, **11**, 139-143.
- Zalevsky, J., Lempert, L., Kranitz, H. and Mullins, R.D. (2001) Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr Biol*, **11**, 1903-1913.
- Zhou, D., Chen, L.M., Hernandez, L., Shears, S.B. and Galan, J.E. (2001) A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol*, **39**, 248-259.
- Zhou, D. and Galan, J. (2001) Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect*, **3**, 1293-1298.
- Zhou, D., Mooseker, M.S. and Galan, J.E. (1999) Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*, **283**, 2092-2095.
- Zigmond, S.H. (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 99-105.

7 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ActA	Aktin-Nukleationsfaktor aus <i>Listeria monocytogenes</i>
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	Actin related protein
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	brain heart infusion
BSA	bovine serum albumine
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
C _c	kritische Konzentration
cDNA	complementary DNA
°C	Grad Celsius
CRIB	Cdc42 and Rac interactive binding
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
downstream	abwärts gelegen
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GBD	GTPase-Bindedomäne
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
human	menschlich
IF	Immunfluoreszenz
IMD	IRSp53/Missing in metastasis-Domäne
InlA	Internalin
InlB	Internalin B
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani broth
M	Molar (Mol/l)
m	Milli
μ	Mikro
mA	Milliampere

mc	monoklonal
Mg	Magnesium
min	Minute
mRFP	monomeric red fluorescent protein
mRNA	messenger RNA
murine	Maus
NEAA	non-essential amino acids
n	Nano
nm	Nanometer
NPF	nucleation promoting factor
N-WASP	neuronales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysii
P _i	anorganisches Phosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
pc	polyklonal
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
P/S	Penicillin/Streptomycin
RCB	Rac-Bindungsmotiv
RickA	Aktin-Nukleationsfaktor aus <i>Rickettsia conorii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
Scar	Suppressor of cAMP activated receptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH	Src-homologe Domäne
s.o.	siehe oben
Sop	<i>Salmonella</i> outer protein
s.u.	siehe unten
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSB	Trypticase soy broth
upstream	aufwärts gelegen
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	volume per volume
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WAVE	Wiskott-Aldrich Syndrom Verprolin homologes Protein
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	weights per volume
x g	x-fache Gravitationskraft
z.B.	zum Beispiel
z.V.g.	zur Verfügung gestellt

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. Wehland für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Bereich durchführen zu können und außerdem für die Übernahme des Referats.

Für die spontane Übernahme des Koreferates und ihr Interesse danke ich Prof. Dr. P. Dersch.

Dr. Theresia Stradal und Dr. Klemens Rottner danke ich für die ausgezeichnete Betreuung, ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft und hervorragende Motivation.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen CYD, SIM und ZIB möchte ich mich für das äußerst angenehme Arbeitsklima bedanken. Die Diskussion nicht-biologischer Themen während der Pausen war äußerst erfrischend! Insbesondere Brigitte Denker, Petra Hagendorff und Marlies Konradt danke ich für ihre unermüdliche und sofortige Hilfsbereitschaft.

Allen unseren Kooperationspartnern danke ich für die zur Verfügung gestellten Antikörper, Konstrukte, Bakterienmutanten und Zelllinien: Prof. Dr. T. Takenawa (Universität Tokio, Japan), Dr. Giorgio Scita (Mailand), Prof. Dr. W.D. Hardt (ETH, Zürich), Dr. Guy Tran Van Nhieu (Institut Pasteur, Paris), Dr. Dirk Bumann (MHH, Hannover) und Dr. Cord Brakebusch (MPI, Martinsried).

Ganz besondere Dank geht auch an Dr. M. Rohde (GBF, Braunschweig) für die elektronenmikroskopischen Analysen von mit *Salmonella typhimurium* infizierten Zellen und Dr. Lothar Gröbe (GBF, Braunschweig) für das FACS-Sorting transfizierter Zellen.

Ein dickes Dankeschön geht an die WOB-Mädels und ganz besonders an Inika. Horido!

Meinem *Soulbrother* danke ich für einfach alles. [Wort fehlt] Fahr den Wagen vor, Harry! ☺

Last but not least danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Steffi für ihre immerwährende und verständnisvolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ohne euch wäre dies alles nicht möglich gewesen! DANKE!